

**HERSTELLUNG UND EIGENSCHAFTEN
EINES XENOGENEN
ANTIRATTENMAKROPHAGENSERUMS
VOM KANINCHEN**

Günter H. Grabs

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung an der
Chirurgischen Klinik der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. W. Brendel

HERSTELLUNG UND EIGENSCHAFTEN
EINES XENOGENEN
ANTIRATTENMAKROPHAGENSERUMS
VOM KANINCHEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Günter H. Grabs
aus
Emmering

München 1975

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Brendel

Mitberichterstatter:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Dezember 1975



INHALTSÜBERSICHT

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	4
I. Versuchstiere	4
II. Herstellung der Immunseren	5
1. Herstellung eines Kaninchen-anti-Ratten- makrophagenserums (AMS)	5
a) Gewinnung der Peritonealzellen	5
b) Bereitung des Immunisierungsmaterials	5
c) Immunisierung	6
2. Herstellung eines Kaninchen-anti-Ratten- lymphozytenserums (ALS)	7
3. Herstellung eines Normalkaninchenserums (NKS)	8
4. Serumgewinnung und Bereitung	8
5. Absorption der Seren	8
a) Absorption mit Rattenerythrozyten	8
b) Absorption mit Rattenlymphozyten	9
III. Tierversuche	9
1. Hauttransplantation	9
a) Allogene Transplantation	9
b) Xenogene Transplantation	11
2. Immunisierung mit Milzzellen	11
3. Immunisierung mit Schaferythrozyten	11
4. Behandlungsschemen	12
IV. Serologische Untersuchungen	13
1. Zytotoxischer Test	13
2. Hämagglutinationstest	14
a) Hämagglutinationstest gegen Ratten- erythrozyten	14
b) Hämagglutinationstest gegen Schaf- erythrozyten	15
3. Geldiffusionstest	15
V. Phagozytostest	15
VI. Blutbilduntersuchungen	16

	Seite
C. ERGEBNISSE	17
I. In vitro Untersuchungen	17
1. Testung der Immunseren in vitro	17
2. Phagozytostest	18
II. In vivo Untersuchungen	20
1. Blutbildveränderungen unter Serumbehandlung	20
a) Verhalten der Lymphozyten	20
b) Verhalten der Granulozyten	25
c) Verhalten der Monozyten	25
2. Hauttransplantation	25
a) Prüfung der immunsuppressiven Wirkung	25
b) Untersuchungen zur Toleranzinduktion	31
3. Beeinflussung der Antikörperbildung gegen Schaferythrozyten	32
D. DISKUSSION	36
I. Allgemeines	36
1. Rolle der Makrophagen in der Immunantwort	36
a) Wirkung der Makrophagen im afferenten Schenkel	37
aa) Bei der Primärantwort	37
bb) Bei der Sekundärantwort	42
b) Wirkung der Makrophagen im efferenten Schenkel	43
2. Aufgaben der Makrophagen bei der Toleranzinduktion	44
3. Die Makrophagen - eine einheitliche Zellart	46
II. Zur Herstellung des Antimakrophagenserums	48
III. Eigenschaften der hergestellten Antimakrophagenseren	53
IV. Immunsuppressive Wirkung von AMS bei Hauttransplantaten und Antikörperbildung gegen Schaferythrozyten	61
V. Toleranzinduktion durch AMS	66
E. LITERATUR	70

A. E I N L E I T U N G

Nicht erst seit der Durchführung von Organtransplantationen sind Fragen, die sich mit der Immunabwehr eines Organismus beschäftigen, brennend geworden. Die Erkenntnis über das Vorhandensein verschiedener Autoimmunerkrankungen ebenso wie die Zunahme der Allergien auf unterschiedlichste Noxen und die Beobachtung, daß bestimmte bösartige Tumoren unter Bedingungen einer abgeschwächten Immunitätslage besonders gut wachsen, haben zu Untersuchungen geführt, die die Grundlagen über den Ablauf einer Immunreaktion erarbeiten und die notwendigen Voraussetzungen feststellen sollten. Während die Problematik einmal darin besteht, die Stärkung einer geschwächten immunologischen Abwehrlage herbeizuführen, gilt es bei Autoimmunerkrankungen durch Immunsuppression eine Besserung zu erzielen oder bei Organtransplantationen durch Induktion einer Immuntoleranz ein störungsfreies und die Organfunktion erhaltendes Einwachsen des Transplantats zu erreichen, ein Verfahren, das bei der Allergiebehandlung unter dem Begriff der Desensibilisierung bereits weiten Eingang in die Klinik gefunden hat.

Über den genauen Ablauf des Immunmechanismus, der durch Aufnahme einer antigenen Substanz über den Lymphweg oder Blutkreislauf einsetzt, besteht bisher allerdings noch keine endgültige Klarheit. Daß Lymphozyten hierbei die Hauptaufgabe zufällt, ist unbestritten. Nach Antigenkontakt wandeln sie sich zu großen pyroninophilen Zellen (Immunoblasten), die nach Zellteilung entweder zu Plasmazellen, welche dann humorale Antikörper bilden, oder wiederum zu kleinen Lymphozyten, sogenannten "Effektorzellen" (Immunozyten) heranreifen, die im Vorgang der Hypersensibilität vom verzögerten Typ die Eigenschaften von Antikörpern übernehmen. Dabei handelt es sich nach neueren Untersuchungen bei den Lymphozyten um keine einheitliche Zellart, vielmehr bewirken sogenannte B-Lymphozyten aus dem Knochenmark

die Bildung humoraler Antikörper und Thymus-abhängige T-Lymphozyten die zelluläre Abwehr (172).

Die bei in vitro Untersuchungen gefundene Erkenntnis, daß in reinen Lymphozytenkulturen zumindest gelegentlich keine Antikörperbildung nachweisbar ist, die erst durch Zugabe von Makrophagen zu solchen Kulturen eintritt (29, 45, 74, 75, 80, 150) gab Hinweise für die Wichtigkeit auch dieser Zellen bei der Immunabwehr. Auch in vivo wurde die Notwendigkeit funktionsfähiger Makrophagen nachgewiesen, da nämlich die immunologische Unreife der Neugeborenen (2,3,24) ebenso wie die Abschwächung der Immunantwort durch Röntgenbestrahlung mit niedrigen Dosen (43,44,60,63) auf mangelnde Reife beziehungsweise Schädigung der Makrophagen zurückzuführen war. Die Mitwirkung der Makrophagen ist in verschiedenen Stadien der Immunantwort denkbar. Im afferenten Schenkel kommt es bei Eintritt des Antigens in den Organismus zunächst zur Aufnahme durch Phagozytose und zur Verarbeitung des Materials in Makrophagen (2,6,29,34,74,75,80, 82,90,118,135,165,166) und anschließend zur Weitergabe einer Information an immunkompetente Lymphozyten (10,20,48,49,50,56, 65, 66,67,71,78,84,85,138, 143). Die Beobachtung der leicht möglichen Toleranzinduktion in neugeborenen und mit niedrigen Röntgendosen bestrahlten Versuchstieren führte MITCHISON (117) zur Formulierung seiner "direct access theory", nach der Lymphozyten nur durch eine von Makrophagen erhaltene Information zur Antikörperbildung angeregt würden, während es nach direktem Kontakt zwischen Antigen und immunkompetenten Lymphozyten zur Ausbildung eines Toleranzstadiums käme (45). Während der Phase der Antikörperbildung durch Lymphozyten wird von diesen gleichzeitig ein Faktor gebildet, mit dem beladen Makrophagen im efferenten Schenkel als Effektorzellen eine spezifische zytotoxische Wirkung entfalten können (14,38,39,102,158).

Allerdings sind die Ergebnisse der einzelnen Untersucher keineswegs einheitlich und bestehen noch erhebliche Differenzen auch in der Deutung der gewonnenen Befunde. Während einige ohne Makrophagenfunktion keine Antikörperbildung nachweisen können (57,61,80,82,85,118), finden andere Phagozytose und

Katabolisierung des Antigens in Makrophagen zwar nützlich, jedoch zur Antikörperbildung nicht unbedingt erforderlich (10,34,39,77,165), wieder andere können Makrophagen im Immunsystem keine Aufgabe zuordnen (42,68,88,136).

Unter der Annahme, daß Makrophagen bei der Immunreaktion eine Rolle spielen, sollte die Auswirkung eines gegen diese Zellen gerichteten Antiserums an immunologischen Testmethoden, wie Bestimmung von Antikörpertitern und an Hauttransplantaten geprüft werden. Es interessierte, inwieweit sich unter Verminderung beziehungsweise Ausschaltung der Makrophagenfunktion eine Immunsuppression einstellen würde oder ob sich möglicherweise sogar die Induktion einer Immuntoleranz erreichen ließe.

B. M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

I. Versuchstiere

Als Empfängertiere bei der Hauttransplantation wurden ebenso wie zur Gewinnung der Peritonealzellen 180-200 Gramm schwere, koloniegezüchtete, männliche Sprague-Dawley-Ratten (Tierzucht Bäumler, Wolfratshausen) verwendet. Zur Erythrozytengewinnung wurden ebensolche Ratten von 400-500 Gramm entblutet.

Nach der Hauttransplantation wurden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten. Die übrigen Tiere wurden jeweils in Gruppen von 10 Tieren in einem Käfig untergebracht. Als Nahrung wurde Rattenfutter (Altromin) und Wasser ad lib. angeboten.

Als Spender der Hauttransplantate dienten einmal 180-200 Gramm schwere DB VI-Ratten (37), die im eigenen Tierstall in strenger Bruder-Schwester-Inzucht weitergezüchtet waren. Ferner verwendeten wir die Haut männlicher, koloniegezüchteter 300-400 Gramm schwerer Meerschweinchen (Bayerische Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung, München-Oberschleißheim) und die Ohrhaut von im Rudel gehaltenen Kaninchen einer kleinwüchsigen Mischrasse (Gewicht 2-3 kg) (Bayerische Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung, München-Oberschleißheim).

Ebensolche Kaninchen dienten zur Gewinnung der Immunseren. Diese Tiere erhielten als Nahrung Fertigfutter (Altromin) und Wasser ad lib. und zusätzlich Grünfutter.

Als Spender der Schaferythrozyten diente eine Schafherde (Bayerische Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung, München-Oberschleißheim). Sie wurden jeweils wöchentlich frisch mit 3,4 %iger Natriumzitratlösung entnommen, dreimal gewaschen, in gepuffelter physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und zwischenzeitlich bei $+4^{\circ}$ C im Kühlschrank aufbewahrt.

II. Herstellung der Immunseren

1. Herstellung eines Kaninchen-anti-Rattenmakrophagen-serums (AMS)

a) Gewinnung der Peritonealzellen

Die Peritonealzellen wurden nach der Methode von FISHMAN (48) angereichert. Ratten wurden unter sterilen Kautelen 5 ml einer 10 %igen Lösung von "Beaf-heart-infusion-broth" (Difco^o) verstärkt mit 10 % "Proteose-peptone" (Difco^o) intraperitoneal injiziert. 48 Stunden später wurden die Tiere durch Dekapieren getötet und gleichzeitig ausgeblutet. Bei der anschließenden Eröffnung der Bauchhöhle wurde dadurch eine Kontamination des Inhalts mit Erythrozyten verhindert. Die Bauchhöhle wurde mit 10 ml Hank'scher Salzlösung, die 10 E Heparin und 1 % Medium 199 (Difco^o) (120) enthielt, ausgespült. Die gesammelten Zellen wurden anschließend zweimal mit steriler Hank'scher Salzlösung bei + 4° C gewaschen. Pro Tier wurden so ca. 80-90 x 10⁶ Zellen gewonnen. Die Zellverteilung war folgendermaßen: 55 - 60 % große, makrophagen-ähnliche Zellen, 25-30 % kleine Lymphozyten, 10-12 % Granulozyten und 3 % Mastzellen. Jeweils 20 Ratten waren erforderlich, um genügend Zellen für die Immunisierung von 10 Kaninchen zu erhalten.

b) Bereitung des Immunisierungsmaterials

Zur Entfernung der Lymphozyten wurden jeweils 3 ml gewaschene Peritonealzellsuspension, die ca 10⁸ Zellen enthielten, mit 2 ml Kaninchen-anti-Rattenlymphozytenserum (ALS) (Leukoagglutination 1 : 1024, Lymphozytotoxizität 1 : 512) und 0,5 ml Meerschweinchenkomplement (Hyland^o) für 90 Minuten bei 37° C inkubiert. Während dieser Zeit wurde durch mehrmaliges, vorsichtiges Umschütteln für eine gute Durchmischung gesorgt. Nach Spontansedimentation wurde der Überstand abgegossen und zum Bodensatz sterile Hank'sche Salzlösung zugegeben und vorsichtig aufgeschüttelt. Nach erneuter Spontansedimentation wurde der Überstand wiederum abgegossen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Das Material enthielt jetzt ca. 85-90 % nicht lebende, große makrophagen-ähnliche Zellen, 10 % Granulozyten

und 5 % deformierte Lymphozyten, Mastzellen und undefinierbare Zelltrümmer (Abb. 1) und wurde zur Immunisierung der Kaninchen verwendet.

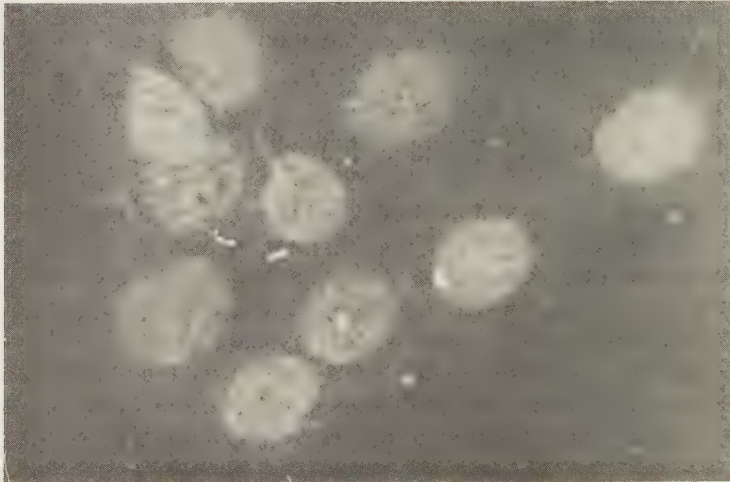


Abb. 1: Immunisierungsmaterial, Peritonealzellen nach Inkubation mit ALS

c) Immunisierung

Die fertiggestellte Peritonealzell suspension wurde jeweils 10 Kaninchen zu gleichen Teilen intraperitoneal injiziert. Jedes Kaninchen erhielt pro Woche 2 Injektionen über 3 Wochen, also insgesamt 6 Injektionen. Jede Injektion enthielt ca $1-3 \times 10^8$ nicht lebende Makrophagen. Gleichzeitig wurden jedem Kaninchen 2 ml ALS der gleichen Charge wie oben intraperitoneal verabreicht. Das ALS wurde dem Immunisierungsmaterial kurz vor der Injektion zugegeben. Nach diesem Schema wurden insgesamt 3 Chargen Antimakrophagenserum gewonnen (Abb. 2).

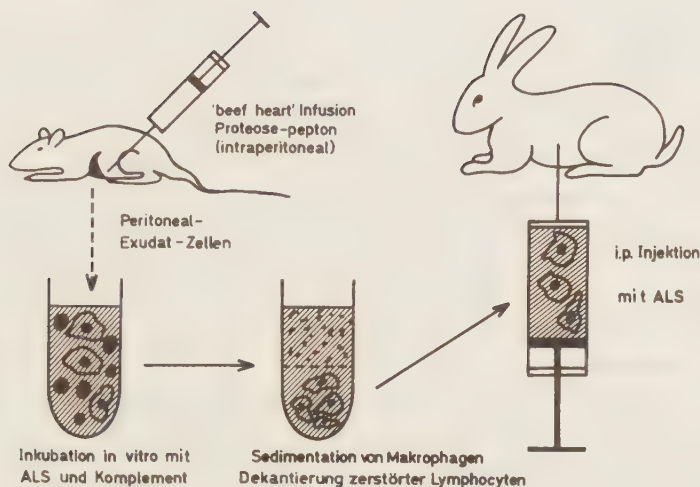


Abb. 2: Immunisierungsschema: Gewinnung und Aufbereitung der Zellen, Immunisierung der Kaninchen unter gleichzeitiger Verabreichung von ALS.

2. Herstellung eines Kaninchen-anti-Rattenlymphozytens- serums (ALS)

Zur Immunisierung der Kaninchen wurden Lymphozyten aus dem Ductus thoracicus der Ratte verwendet. Die Gewinnung der Zellen erfolgte durch Anlegen einer Lymphfistel nach der leicht modifizierten Technik von BOLLMAN (23), die bei (144) ausführlich beschrieben ist. Die ablaufende Lymphe wurde in einem Gefäß mit heparinisierter Hank'scher Lösung aufgefangen und anschließend 15 Minuten bei 150 g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde danach zweimal in Hank'scher Lösung (10 Minuten bei 150 g) gewaschen und zur Injektion in geeigneter Verdünnung in dieser Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bis zur Verwendung bei + 4° C aufbewahrt. Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte über 3 Wochen durch zweimalige wöchent-

liche Injektionen der Lymphozytensuspension (Zellzahl: $5-10 \times 10^7$ pro Injektion und Tier) intraperitoneal.

3. Herstellung eines Normalkaninchenserums (NKS)

Nichtbehandelte Kaninchen der gleichen Mischrasse wurden zur Gewinnung von Normalkaninchenserum verwendet.

4. Serumgewinnung und Bereitung

Nichtimmunisierte Tiere wurden ebenso wie immunisierte Tiere 6 Tage nach der letzten Injektion entblutet. Dazu wurden die Kaninchen mit Nembutal (Deutsche Abbot AG, 50 mg/kgKg - i.v.) narkotisiert, die A. carotis freipräpariert, kanüliert und das Blut in sterilen Behältern aufgefangen. Pro Tier ergab sich eine Blutmenge zwischen 150 und 250 ml.

Nach vollständiger Gerinnung des Blutes innerhalb 24 Std. wurde das Serum abzentrifugiert, gepoolt und im Wasserbad bei 56°C zur Inaktivierung des Komplementes 30 min lang inkubiert. Bis zur Verwendung wurde es bei -20°C gelagert

5. Absorption der Seren

a) Absorption mit Rattenerythrozyten

Alle drei Seren (AMS, ALS, NKS) wurden mit Rattenerythrozyten absorbiert, um die Hämagglutinine zu entfernen. Die hierzu benötigten Rattenerythrozyten wurden aus heparinisiertem Rattenblut (Punktion der Aorta abdominalis an der mit Chloralhydrat, 360 mg/kgKg, narkotisierten Ratte) durch Abzentrifugieren und dreimaliges Waschen der Erythrozyten in Phosphatpufferlösung ($\text{pH} = 7,2$) gewonnen. Die leukozytenreiche oberste Schicht wurde nach jedem Zentrifugieren zusammen mit dem Überstand abgesaugt, um möglichst reine Erythrozyten zu gewinnen.

Serum und Erythrozytenkonzentrat wurden im Verhältnis 1 : 1 gemischt und für 120 min bei 37°C inkubiert. Für AMS und NKS erwies sich ein Absorptionsschritt als ausreichend, um die Hämagglutinine ebenso wie Spuren präzipitierender Antikörper gegen Serumproteine wirksam zu entfernen. Zur ausreichenden Entfernung der Hämagglutinine des ALS mußten 2 Absorptionsschritte durchgeführt werden.

b) Absorption mit Rattenlymphozyten

Zum Nachweis der Spezifität der hergestellten Seren wurden zusätzlich kleine Mengen aus 2 Chargen des AMS und ALS mit Rattenlymphozyten absorbiert. Hierzu wurden Lymphknoten und Thymus aus dekapitierten Ratten sauber präpariert, zerkleinert, durch ein feinmaschiges Sieb passiert und einmal im Porter homogenisiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal in Phosphatpufferlösung (pH = 7,2) gewaschen.

Das Lymphozytenkonzentrat wurde mit Serum im Verhältnis 1 : 2 durchmischt und für 120 min bei 37° C inkubiert.

III. Tierversuche

1. Hauttransplantation

Zur Gewinnung der Hauttransplantate war eigens eine Stanze entwickelt worden, die jeweils gleich große (10 mm im Durchmesser), runde Transplantate herstellte. Ein zylinderförmiges Messer wurde durch Stanzdruck gegen eine Kunststoffscheibe gedrückt. Durch Zwischenlegen der Haut kam es so zu einer scharfen, kreisrunden Durchtrennung derselben und zu gleichgroßen Hautdefekten.

a) Allogene Transplantation

Bei der allogenen Transplantation wurde die Rückenhaut eines DB VI Stammes auf den Rücken der koloniegezüchteten, männlichen Sprague-Dawley-Ratten übertragen. Den mit Chloralhydrat (360 mg/kgKg) anästhesierten Spender- und Empfängertieren wurde zunächst mit einer Haarschneidemaschine der Rücken rasiert. Der engere Transplantationsbereich wurde anschließend mit Pilca^o (Fa. Olivin, Wiesbaden) völlig haarfrei gemacht und mit Alkohol gereinigt.

Das Instrumentarium war primär sterilisiert, wurde jedoch in einer Transplantationsserie (ca. 20 Tiere) nicht zwischensterilisiert, so daß von einem Vorgehen unter streng aseptischen Kautelen nicht gesprochen werden kann.

Die Rückenhaut des Empfängertieres wurde in einer Falte hochgezogen ohne eine zu große Spannung entstehen zu lassen, so daß mit der Stanze 2 gleich große, runde, ca. 10 mm große Hautstücke entfernt wurden und zwei ebensolche Defekte entstanden. Es wurden zur weiteren Transplantation nur solche Tiere verwendet, bei denen es nicht zu einer Blutung aus eröffneten Gefäßen gekommen war. Insgesamt war diese Komplikation selten, so daß Tiere mit Blutungen im Bereich des Transplantationsbettes verworfen wurden. Bei den Spendertieren wurde die Haut am Schwanz beginnend von dem Unterhautgewebe abpräpariert und jeweils nur einfach durchgestanzt, um von einem Spendertier möglichst viele Transplantate zu gewinnen. Diese Tiere wurden abschließend getötet.

Zur Übertragung kamen Vollhauttransplantate. Durch die besonderen anatomischen Gegebenheiten bei der Ratte, bei der Cutis und Subcutis durch eine Fett- und Bindegewebsschicht fest mit der Muskulatur verwachsen sind (18), war es notwendig, die gewonnenen Transplantate sorgfältig von dieser Fett- und Bindegewebsschicht zu befreien. Dieses wurde durch scharfe Präparation mit der Schere erreicht.

Jetzt wurde das Spendertransplantat in den linken Defekt der Empfängerratte eingesetzt und die Ränder durch vorsichtiges Kleben mit Histoacryl-N-blau^o (Braun-Melsungen^o) befestigt. Zur Kontrolle der Technik wurde jeweils die eigene Haut des Empfängertieres nach gleichartiger Präparation von der linken Seite in den rechten Defekt eingeklebt. Diese Haut war in jedem durchgeführten Versuch eingewachsen. Die Haut der rechten Seite wurde verworfen. Zum Schutz der Transplantate wurden Stahldrahtgitter darüber befestigt. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen gehalten.

Ab dem 7. bis 8. Tag wurden die Transplantate täglich kontrolliert. Hierzu wurden die Gitter entfernt, um die Beurteilung sowohl durch Betrachten als auch durch Betasten durchzuführen. Entsprechend anderen Untersuchern (18) fanden auch wir zunächst eine mäßige ödematöse Schwellung und anschließende Dunkelfärbung der Transplantate. Ein Hauttransplantat wurde als abgestoßen gewertet, wenn 10 % der übertragenen Haut als dunkel verfärbt gefunden wurde.

b) Xenogene Transplantation

Bei der xenogenen Transplantation wurde einmal die Ohrhaut willkürlich ausgewählter Kaninchen und in einem Versuch die Rückenhaut eines Meerschweinchens verwendet. Die Haut wurde in gleicher Weise enthaart und das Transplantat nach Abpräparieren der Haut einfach ausgestanzt. Auch hier wurden Fett- und Bindegewebe sauber abpräpariert und das fertige Transplantat in den linken Defekt der Empfängerratte eingeklebt. Die weitere Behandlung erfolgte wie oben.

2. Immunisierung mit Milzzellen

14 Tage vor Hauttransplantation wurden einige Ratten mit Milzzellen immunisiert. Es wurden Milzzellen sowohl der DB VI - Ratte (allogene Versuche) als auch eines Kaninchens (xenogene Versuche) verwendet. Um im xenogenen Versuch dabei genetisch gleiches Gewebe zu verwenden, wurde zunächst ein Kaninchen splenektomiert und postoperativ bis zur Verwendung der Ohrhaut gepflegt. Im allogenen System war diese Maßnahme wegen der Verwendung eines Inzuchtstammes als Spender nicht erforderlich.

Die Milzen wurden nach Entfernung zerkleinert, durch ein feinmaschiges Drahtsieb passiert und einmal im Porter homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Da bei den allogenen Versuchen einmal mit niedrigen und einmal mit höheren Antigendosen immunisiert werden sollte, wurden zwei Rattenmilzzellensuspensionen hergestellt, die eine enthielt 4×10^6 und die andere 4×10^8 Zellen pro ml. Die Kaninchenmilzzellensuspension wurde auf 5×10^7 Zellen pro ml eingestellt. Jeweils 1 ml der entsprechenden Suspension wurde den Empfängerratten intraperitoneal injiziert.

3. Immunisierung mit Schafererythrozyten

Eine Untersuchung zur Bildung humoraler Antikörper wurde mit Schafererythrozyten durchgeführt. Zur Immunisierung wurden aus der Stammlösung gewaschener Schafererythrozyten durch Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung vier Erythrozytensuspensionen hergestellt, die 10^8 , 10^6 , 10^5 und 10^3 Schafererythrozyten

pro ml enthielten. Nach entsprechender Vorbehandlung mit AMS (siehe Behandlungsschemen) erhielt eine Gruppe 10^7 , eine zweite 10^5 und eine dritte Gruppe 10^3 Schafererythrozyten, das heißt, je 1 ml der entsprechend erstellten Suspension als primäre Antigendosis intraperitoneal injiziert. Die unbehandelte Kontrollgruppe erhielt 10^8 Schafererythrozyten. Vierzehn Tage nach der ersten Antigendosis erhielten alle Tiere gleich 10^8 Schafererythrozyten als Booster-Injektion, hier wurde eine weitere Kontrollgruppe zugeschaltet, die nur diese eine Antigendosis von 10^8 Schafererythrozyten erhielt. Sieben Tage später wurden die Tiere entblutet, die Seren gewonnen und bei 56°C hitzeinaktiviert. Anschließend wurden die Hämagglutinationstiter gegen Schafererythrozyten festgestellt.

4. Behandlungsschemen

Zum Einsatz kamen folgende Seren (siehe auch Tabelle 1):

AMS_{1,2,3}: jeweils mit Rattenerythrozyten absorbierte Antimakrophagenseren der Chargen 1, 2 und 3.

AMS_{3a}: Zusätzlich mit Rattenlymphozyten absorbiertes Antimakrophagenserum der Charge 3.

ALS: Mit Rattenerythrozyten absorbiertes Antilymphozytenserum.

ALS_a: Zusätzlich mit Rattenlymphozyten absorbiertes Antilymphozytenserum der gleichen Charge.

NKS_u: Unabsorbiertes Normalkaninchenserum.

NKS: Mit Rattenerythrozyten absorbiertes Normalkaninchen-serum.

In jeder Versuchsserie wurden Gruppen zu 10 Ratten mit dem gleichen Serum behandelt und 10 unbehandelte Ratten zur Kontrolle mitgeführt. Die Behandlung erfolgte intraperitoneal, jeweils 2 ml Serum wurden in zwei Einzeldosen zu 1 ml pro Behandlungstag injiziert.

a) Zur Untersuchung der immunsuppressiven Wirkung an allogenen oder xenogenen Hauttransplantaten wurde einmal an den Tagen +1, +3 und +5 (insgesamt 6 ml Serum pro Tier) mit AMS_{2,3},

AMS_{3a}, ALS, ALS_a, NKS_u und NKS behandelt.

In einer weiteren Serie wurde an den Tagen -7 bis +2 (insgesamt 20 ml Serum pro Tier) mit AMS₃, ALS, NKS_u und NKS behandelt. Die Transplantation erfolgte am Tag 0.

b) In Versuchen zur Toleranzinduktion wurde an den Tagen -4 bis +2 (insgesamt 14 ml Serum pro Tier) mit AMS_{1,2} und ALS behandelt. Die Immunisierung mit Milzzellen erfolgte am Tag 0, die Hauttransplantation am Tag 14.

c) In Versuchen zur Beeinflussung der Bildung humoraler Antikörper gegen Schaferythrozyten wurde an den Tagen -2 bis +2 (insgesamt 10 ml Serum pro Tier) mit AMS und ALS behandelt und die erste Antigendosis am Tag 0 verabfolgt.

d) Zur Untersuchung, welche Auswirkungen die Seruminjektionen auf das weiße Blutbild der Ratte haben, wurde über den Untersuchungszeitraum jeweils 1 ml AMS oder NKS_u pro Ratte nur morgens verabreicht.

IV. Serologische Untersuchungen

Tests wurden zum Nachweis zytotoxischer Antikörper gegen Makrophagen und Lymphozyten und zum Nachweis agglutinierender Antikörper gegen Erythrozyten in den entsprechend hergestellten Immunseren durchgeführt. Um möglicherweise vorhandene kreuzreagierende Antikörper zu erkennen oder auszuschließen, wurden bei allen Untersuchungen neben den Kontrollen mit NKS sowie mit Zellsuspension und Verdünnungsmedium allein die Immunseren gegen alle geprüften Zellarten getestet.

1. Zytotoxischer Test

Die Isolierung der Zellen und die Durchführung des Testes wurde mit geringen Veränderungen nach der Methode von KISSMEYER-NIELSEN und KERBYE (89) und WALFORD, GALLAGHER und TROUP (173) durchgeführt. Die Lymphozyten wurden gewonnen, indem frisch defibriniertes Blut zur Eliminierung der Erythrozyten zunächst dextransedimentiert wurde. Anschließend wurden die Leukozyten durch Inkubation mit Terryline⁰ (Trevira Kardenband, Hoechst)

getrennt und abschließend Albumin flottiert. Die Peritonealzellen wurden wie bereits oben beschrieben gewonnen. Zu jedem Test wurden beide Zellarten, Peritonealzellen und Lymphozyten frisch gewonnen und nach zweimaligem Waschen in autologes Serum resuspendiert. Das Reaktionsgemisch des Tests enthielt jeweils 0,1 ml des zu testenden Serums in einer mit gepufferter Salzlösung hergestellten zweifachen Serumverdünnungsreihe, 0,1 ml Zellsuspension ($5-8 \times 10^3$ Zellen pro ml enthaltend) und 0,05 ml unverdünntes Meerschweinchenkomplement. Nach Inkubation bei 37°C für 90 Minuten wurde Trypan blue zugegeben und das Gemisch auf einen Objektträger übertragen. Das Ablesen erfolgte etwa 5-10 Minuten nach Zugabe der Farbe unter dem Lichtmikroskop. Der Prozentsatz gefärbter Makrophagen bei der Peritonealzellsuspension (nur als große, makrophagen-ähnliche Zellen zu identifizierende Zellen wurden gewertet) wie auch der gefärbten Lymphozyten wurde ermittelt. Bei mehr als 20 % gefärbten Zellen wurde ein zytotoxischer Effekt angenommen.

2. Hämagglutinationstest

a) Hämagglutinationstest gegen Rattenerythrozyten

Als Antigen dienten frisch gewonnene Rattenerythrozyten. EDTA-Blut wurde Dextran-sedimentiert und das Sediment zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Die Zellsuspension wurde mit physiologischer Kochsalzlösung anschließend so weit verdünnt, daß sie pro ml 8×10^7 Erythrozyten enthielt. Eine zweifache Serumverdünnungsreihe der Testseren wurde mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. In Röhrchen wurde zu 0,1 ml Antiserum beziehungsweise Antiserumverdünnung 0,1 ml Zellsuspension gegeben und für 90 Minuten bei 37°C und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach vorsichtigem Aufschütteln der Röhrchen wurde je ein Tropfen auf einen Objektträger pipettiert und das Ergebnis mikroskopisch abgelesen. Als Titer wurde die Verdünnung angegeben, bei der im Sichtfeld fast alle Zellen mindestens in kleinen Aggregaten (3-4 Zellen agglutiniert) und nur wenige Zellen nicht agglutiniert waren.

b) Hämagglutinationstest gegen Schafererythrozyten

Bei den mit Schafererythrozyten immunisierten Ratten wurde zur Feststellung der Immunantwort der Hamagglutinationstest mit Schafererythrozyten durchgeführt. Als Antigen dienten hierbei frisch gewonnene Schafererythrozyten. Der Test wurde im übrigen wie oben beschrieben durchgeführt.

3. Geldiffusionstest

Zum Nachweis beziehungsweise Ausschluß präzipitierender Serumantikörper führten wir den Doppeldiffusionstest von OUCHTERLONY (131) aus.

V. Phagozytostest

Zur Phagozytose wurden den Peritonealzellen zwei Körper angeboten, die normalerweise auch unter in vitro-Bedingungen gut aufgenommen werden. Einmal wurden Schafererythrozyten verwendet und zum anderen Kohlepartikel (Suspension C 11/1431 a, Fa. Günther Wagner, Pelikan Werke, Hannover) (125). Die Schafererythrozyten wurden vor Verabreichung zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und anschließend in der gleichen Lösung aufgeschwemmt. Die Kohleteilchensuspension wurde so verwendet, wie sie von der Fa. Pelikan geliefert war. Die Peritonealzellen wurden in üblicher Weise gesammelt. Nach zweimaligem Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung wurden die Zellen in autologes Serum so resuspendiert, daß in 5 ml ca. 10^8 Zellen enthalten waren. Diese wurden entweder mit 1 ml AMS oder mit 1 ml NKS_u für 30 Minuten bei 37° C inkubiert und anschließend dreimal mit Hank'scher Lösung gewaschen. Abschließend wurden die Zellen wiederum in autologes Serum resuspendiert und nun entweder mit Schafererythrozyten oder mit Kohleteilchen für 2 Stunden bei 37° C inkubiert. Jetzt wurde einmal mit Hank'scher Lösung gewaschen, um die nicht phagozytierten Teilchen zu entfernen und Zellausstriche angefertigt. Diese wurden dann mikroskopisch untersucht und die einzelnen Makrophagen je nach Menge der aufgenommenen Teilchen beziehungsweise Erstthrozyten in vier Gruppen eingeteilt: keine, schwache

(1-2 Teilchen), mittelstarke (3-4 Teilchen) und starke (5 und mehr Teilchen) Phagozytose.

VI. Blutbilduntersuchungen

Blutbildveränderungen unter AMS Behandlung wurden in einer besonderen Versuchsreihe untersucht. Dabei wurden jeweils vor, 30, 60 und 180 Minuten nach Injektion von 1 ml AMS i.p. täglich über 8 Tage die Leukozytenzahl durch Auszählen in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die relativen Anteile der einzelnen Zellarten wurden durch Differenzieren des nach Pappenheim gefärbten Blutaussstrichs bestimmt. Die hierzu erforderlichen Blutentnahmen erfolgten jeweils durch Lanzettstich aus der Schwanzvene. Aus den Befunden wurde die Absolutzahl der Zelle errechnet. Kleine und große Lymphozyten wurden nicht unterschieden. Normalwerte wurden über 3 Tage je früh und abends bestimmt, ihr Mittelwert wurde als Ausgangswert angegeben. Diese Werte wurden mit Ergebnissen verglichen, die in früheren Untersuchungen unter ALS Behandlung gefunden waren (94, 144).

C. ERGEBNISSE

I. In vitro Untersuchungen

1. Testung der Immunseren in vitro

Tab. 1: Antikörpertiter gegen Rattenzellen verschiedener verwendeter Immunseren vor und nach Absorption

Seren	absorbiert mit	Zytotoxische Antikörper gegen		Hämagglutininierende Antikörper	Präzipitierende Antikörper
		Makrophagen	Lymphozyten		
NKS u	.-.	1 : 2	1 : 2	1 : 4	Ø
NKS	Ratten-erythrozyten	1 : 1	1 : 1	1 : 0	Ø
AMS lu	.-.	1 : 64	1 : 2	1 : 16	Ø
AMS 1	Ratten-erythrozyten	1 : 32	1 : 1	1 : 2	Ø
AMS 2u	.-.	1 : 128	1 : 4	1 : 32	Ø
AMS 2	Ratten-erythrozyten	1 : 64	1 : 2	1 : 4	Ø
AMS 3u	.-.	1 : 128	1 : 4	1 : 32	Ø
AMS 3	Ratten-erythrozyten	1 : 64	1 : 2	1 : 2	Ø
AMS 3a	Ratten-erythrozyten* +lymphozyten	1 : 32	1 : 1	1 : 1	Ø
ALS u	.-.	1 : 16	1 : 512	1 : 64	Ø
ALS	Ratten-erythrozyten	1 : 8	1 : 256	1 : 4	Ø
ALS a	Ratten-erythrozyten* +lymphozyten	1 : 0	1 : 8	1 : 2	Ø

* Absorbiert wurde mit einer Suspension, die durch Homogenisierung von Rattenmilzen und -thymus hergestellt war.

Agglutinierende Antikörper gegen Erythrozyten der Ratte und zytotoxische Antikörper gegen Makrophagen und Lymphozyten der Ratte wurden an inaktivierten, gepoolten Seren bestimmt.

Die zytotoxischen Antikörper gegen Makrophagen lagen bei den hergestellten Antimakrophagenseren bei 1:128 bis 1:64 und fielen nach Absorption mit Rattenerythrozyten um eine Stufe ab. Nach zusätzlicher Absorption mit einer aus Rattenmilzen und -thymus hergestellten Suspension war ein weiterer Abfall um eine Titerstufe zu beobachten (AMS 3a). Die zytotoxischen Antikörper gegen Lymphozyten lagen bei diesen Seren bei 1:4 bis 1:2 (unabsorbiert), 1:2 bis 1:1 (einmal mit Rattenerythrozyten absorbiert) und 1:1 bei zusätzlicher Absorption mit Rattenlymphozyten.

Bei den verwendeten Antilymphozytenseren lag der zytotoxische Titer gegen Lymphozyten bei 1:512 und nach einmaliger Absorption mit Rattenerythrozyten bei 1:256. Nach zusätzlicher Absorption mit Rattenmilz- und -thymuszellensuspension fiel der Titer auf 1:8 ab. Der zytotoxische Antikörpertiter gegen Makrophagen war 1:16 (unabsorbiert), 1:8 (einmal mit Rattenerythrozyten absorbiert) und 1:0 nach zusätzlicher Absorption mit Rattenlymphozyten.

Die hämagglutinierenden Antikörper der hergestellten Immunseren lagen bei 1:64 bis 1:16 und konnten in einem Absorptionsschritt weitgehend entfernt werden (Titer 1:4 bis 1:2).

Präzipitierende Antikörper fanden sich nicht.

Die im Normalkaninchenserum vorhandenen zytotoxischen Antikörper gegen Makrophagen und Lymphozyten (Titer 1:2) und hämagglutinierenden Antikörper (Titer 1:4) waren nach einmaliger Absorption mit Rattenerythrozyten entfernt.

2. Phagozytostest

Zum Nachweis der Phagozytosehemmung durch AMS im Vergleich zu ALS und NKS wurden zwei unterschiedliche Körper verwendet. Nach 30 minütiger Inkubation der Peritonealzellen bei 37° C mit den jeweiligen inaktivierten Immunseren in Abwesenheit von Komplement und anschließend dreimaligem Waschen mit Hank'scher Salzlösung wurden die Zellen in autologem Rattenserum aufgeschwemmt. Nun

wurden in überschüssiger Menge einmal Schafer erythrozyten und zum anderen Kohlepartikel zugesetzt und für weitere 2 Stunden bei 37° C inkubiert, wobei die Suspension zur besseren Durchmischung zwischenzeitlich aufgeschüttelt wurden. Nach erneutem Waschen wurden Zellausstriche angefertigt, gefärbt und ausgewertet, die Ergebnisse sind in den Tabellen 2 und 3 dargestellt.

Tab. 2: Phagozytose von Schafer erythrozyten durch Makrophagen nach Inkubation mit Immunsereen.

Seren	Phagozytose*			
	keine ¹⁾	schwach ²⁾	mittel ³⁾	stark ⁴⁾
AMS	13	39	25	23
ALS	5	18	36	41
NKS	3	15	33	49

Tab. 3: Phagozytose von Kohlepartikeln durch Makrophagen nach Inkubation mit Immunsereen.

Seren	Phagozytose*			
	keine ¹⁾	schwach ²⁾	mittel ³⁾	stark ⁴⁾
AMS	17	36	26	21
ALS	8	12	33	47
NKS	5	16	31	48

* Angaben in % bei ca 500 ausgezählten Zellen.

1) keine Teilchen intrazellulär nachweisbar.

2) 1 - 2 " in Makrophagen " .

3) 3 - 4 " " " " .

4) 5 und mehr " " " " .

Während sich bei mit ALS und NKS vorbehandelten Makrophagen keine wesentlichen Unterschiede ergeben, zeigt sich nach Behandlung der Makrophagen mit AMS eine deutliche Verminderung der Phagozytose sowohl für Schafer erythrozyten als auch für Kohlepartikel. Diese Verminderung gilt sowohl im Hinblick auf die Anzahl der phagozytierenden Zellen als auch auf die pro Zelle aufgenommene Menge. Eine vollständige Phagozytosehemmung konnte unter den gewählten Bedingungen jedoch nicht erreicht werden.

II. In vivo Untersuchungen

1. Blutbildveränderungen unter Serumbehandlung

Bei der Beobachtung des weißen Blutbildes unter der Behandlung mit AMS oder NKS wurden 2 Gruppen von je 10 Tieren gebildet. Die Ausgangswerte (100 %) wurden aus sechs an den drei vorhergehenden Tagen abgenommenen Normalwerten ermittelt. Anschließend erhielten die Versuchstiere über 8 Tage jeweils nach Abnahme eines Morgenwertes 1 ml Serum i.p. injiziert, weitere Entnahmen folgten nach 30, 60 und 180 Minuten. Die gefundenen Werte (Tabelle 4 unter AMS Behandlung, Tabelle 5 unter Behandlung mit NKS) wurden mit den in einer früheren Untersuchung (144) (Tabelle 6) unter Behandlung mit ALS gefundenen verglichen, wobei seinerzeit wegen des längeren Untersuchungszeitraums nicht täglich und höchstens zwei Werte pro Tag bestimmt wurden. Außerdem wurde auf das Verhalten der Monozyten kein Augenmerk gerichtet.

a) Verhalten der Lymphozyten (Abb. 3)

Es zeigte sich eine mäßige, vorübergehende Lymphopenie nach der täglichen Injektion von 1 ml AMS. Dem initialen Abfall der Lymphozyten folgte eine schnelle Rückkehr auf 80-90 % des Ausgangswertes. Ein ähnlicher Effekt war nach der täglichen Injektion von NKS zu beobachten, wobei die Lymphozytenwerte in der schnellen Erholungsphase auf Werte von über 100 % anstiegen. Außerdem waren die Tagesschwankungen höher. Unter der Behandlung mit ALS fand sich eine bemerkenswerte und andauernde Lymphopenie über den gesamten Behandlungszeitraum.

Tab. 4: Veränderungen des weißen Blutbildes der Ratte im Verlauf einer achttägigen AMS-Behandlung.

Tage vor (v) und nach (30',60',180') Injektion von 1 ml AMS i.p.		Granulozyten *		Lymphozyten *		Monozyten *	
Durchschnitt von 6 Einzelwerten = 100 %		2061	± 279	12910	± 498	1376	± 136
1	v	2554	± 401	12110	± 612	1568	± 339
	30'	1297	± 336	9410	± 1023	1170	± 141
	60'	867	± 135	7080	± 821	541	± 90
	180'	2985	± 501	9220	± 740	671	± 135
2	v	1725	± 314	11660	± 1345	963	± 213
	30'	1121	± 306	9380	± 1348	888	± 171
	60'	695	± 135	8180	± 849	576	± 79
	180'	3056	± 784	10640	± 1179	1108	± 214
3	v	1952	± 329	11430	± 1173	1152	± 147
	30'	1891	± 377	9660	± 1169	1062	± 163
	60'	2010	± 504	8430	± 1064	1152	± 187
	180'	5085	± 848	9330	± 925	1855	± 288
4	v	2296	± 408	9880	± 509	1285	± 182
	30'	2530	± 732	10010	± 733	1250	± 320
	60'	3041	± 563	9740	± 853	1340	± 336
	180'	5004	± 1200	10890	± 1370	1598	± 404
5	v	2412	± 656	9730	± 771	1211	± 250
	30'	2602	± 470	8410	± 594	1010	± 121
	60'	1611	± 284	7690	± 749	966	± 213
	180'	4812	± 685	8930	± 778	1117	± 260
6	v	3599	± 632	9680	± 1008	1336	± 130
	30'	2222	± 300	8630	± 715	855	± 122
	60'	1522	± 227	8650	± 929	998	± 126
	180'	5244	± 1110	10350	± 1208	1418	± 228
7	v	5284	± 1041	12030	± 952	1826	± 262
	30'	2804	± 558	7890	± 710	975	± 127
	60'	1682	± 485	7330	± 627	1250	± 155
	180'	5183	± 1309	9230	± 744	1765	± 257
8	v	4441	± 962	11190	± 1327	1574	± 220
	30'	3879	± 1065	7630	± 752	1190	± 314
	60'	2213	± 502	7170	± 722	1161	± 115
	180'	5193	± 2040	7140	± 1017	948	± 130

* Mittelwerte und Standardabweichungen ($\bar{x} \pm s_x$) von jeweils 10 Ratten.

Tab. 5: Veränderungen des weißen Blutbildes der Ratte im Verlauf einer achttägigen NKS-Behandlung.

Tage vor (v) und nach (30', 60', 180') Injektion von 1 ml NKS i.p.		Granulozyten *		Lymphozyten *		Monozyten *	
Durchschnitt von 6 Einzelwerten = 100 %		3584	± 649	12910	± 498	1407	± 166
1	v	4687	± 596	11880	± 803	1247	± 208
	30'	4305	± 904	7340	± 618	851	± 114
	60'	5592	± 641	8030	± 674	1232	± 148
	180'	8315	± 1980	11820	± 1061	3426	± 490
2	v	4795	± 624	13150	± 990	1239	± 271
	30'	4284	± 532	9330	± 710	1055	± 134
	60'	3416	± 477	7420	± 775	861	± 132
	180'	9225	± 1120	9280	± 1024	1902	± 278
3	v	4708	± 777	11900	± 764	1762	± 244
	30'	2891	± 503	9880	± 819	1221	± 170
	60'	3398	± 735	7420	± 739	726	± 103
	180'	9156	± 1414	10450	± 1094	2055	± 257
4	v	3004	± 294	13670	± 555	1229	± 179
	30'	3491	± 615	9180	± 686	938	± 155
	60'	2904	± 504	7560	± 318	806	± 157
	180'	8333	± 1247	12260	± 773	2965	± 439
5	v	3157	± 555	12170	± 987	1339	± 247
	30'	4152	± 1160	10780	± 635	1006	± 156
	60'	3887	± 675	9230	± 886	1150	± 166
	180'	9152	± 918	14350	± 1275	1338	± 179
6	v	3643	± 462	13820	± 1093	1823	± 226
	30'	2920	± 491	9580	± 598	1303	± 133
	60'	3360	± 777	8430	± 774	1140	± 121
	180'	8765	± 1410	11950	± 901	1784	± 280
7	v	3904	± 569	15880	± 1047	1691	± 210
	30'	3768	± 565	11500	± 863	1724	± 375
	60'	2710	± 266	7450	± 452	958	± 88
	180'	7255	± 1249	12860	± 767	2403	± 367
8	v	5098	± 738	16770	± 2180	2004	± 262
	30'	3837	± 550	10820	± 956	1152	± 146
	60'	3066	± 388	8790	± 737	939	± 149
	180'	7945	± 1537	13960	± 841	2387	± 427

* Mittelwerte und Standardabweichungen ($\bar{x} \pm sx$) von jeweils 10 Ratten.

Tab. 6: Veränderungen des weißen Blutbildes der Ratte im Verlauf einer neuntägigen ALS-Behandlung.

Tage vor (v) und 4 Stunden nach (a) Injektion von 1 ml ALS i.p.		Granulozyten *		Lymphozyten *	
Durchschnitt von 3 Normalwerten = 100 %		4030	± 694	14800	± 1586
1	n	6800	± 1033	2620	± 1435
2	v	3790	± 575	4700	± 2220
3	v	3530	± 703	2500	± 585
	n	3330	± 304	1070	± 510
4	v	4990	± 1397	2590	± 952
	n	4850	± 2285	2070	± 1130
5	v	6650	± 1772	2970	± 1403
7	v	5670	± 3847	2620	± 1026
	n	10060	± 4439	1810	± 1372
9	v	14220	± 5795	3250	± 3767

* Mittelwerte und Standardabweichungen ($\bar{x} \pm sx$) von jeweils 10 Ratten.

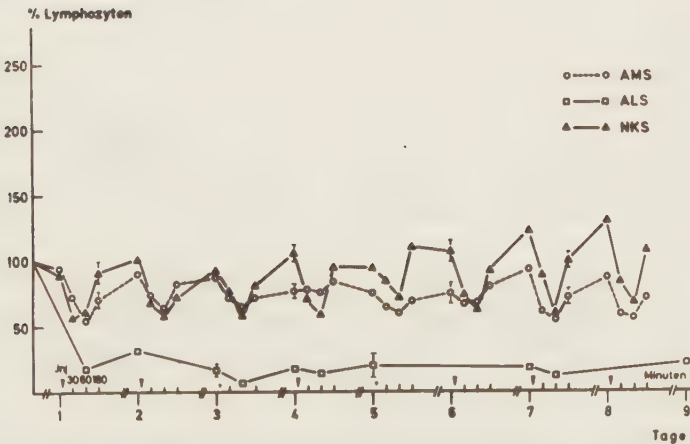


Abb. 3: Veränderungen der Lymphozytenwerte im peripheren Blut der Ratte unter der täglichen Behandlung mit 1 ml AMS i.p. im Vergleich zu ALS und NKS (n = 10).

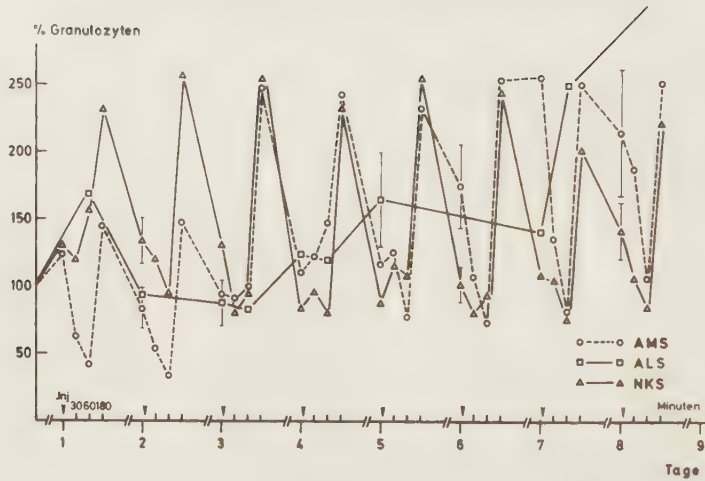


Abb. 4: Veränderungen der Granulozytenwerte im peripheren Blut der Ratte unter der täglichen Behandlung mit 1 ml AMS i.p. im Vergleich zu ALS und NKS (n = 10).

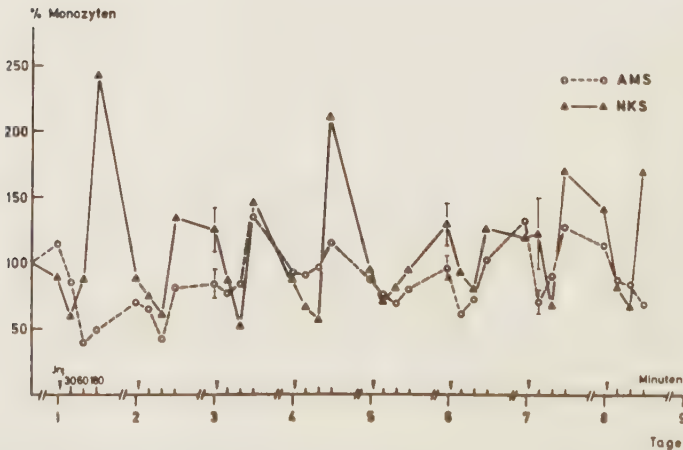


Abb. 5: Veränderungen der Monozytenwerte im peripheren Blut der Ratte unter der täglichen Behandlung mit 1 ml AMS i.p. im Vergleich zu NKS (n = 10).

b) Verhalten der Granulozyten (Abb. 4)

Nach AMS-Gabe kam es an den ersten beiden Tagen zu einem ausgeprägten initialen Abfall auf Werte von 35-40 %, die nach ALS- und NKS-Behandlung nicht auftraten. Ab dem dritten Behandlungstag verhielten sich alle drei Gruppen wesentlich gleichartig. Während die ersten drei Tageswerte zwischen 80 und 140 % lagen, war der nach drei Stunden abgenommene Wert mit 230 - 260 % des Ausgangswertes jeweils stark erhöht.

c) Verhalten der Monozyten (Abb. 5)

Hier zeigt sich ebenfalls an den ersten zwei Behandlungstagen in der mit AMS behandelten Gruppe ein stärkerer Abfall auf Werte zwischen 40 und 70 % des Ausgangswertes, während die mit NKS behandelten Tiere lediglich auf 60 - 90 % abfallen. Anschließend verhalten sich auch hier beide Gruppen gleichartig, bei der mit NKS behandelten Gruppe zeigen sich allerdings erheblich größere Tagesschwankungen.

2. Hauttransplantation

Die Wirkung von AMS im Vergleich zu ALS, NKS und unbehandelten Kontrollen bei der zellulären Abwehr wurde an durchgeführten Hauttransplantaten geprüft. Dabei sollte einmal nachgewiesen werden, ob dem hergestellten AMS eine immunsuppressive Wirkung zukommt und wenn ja, ob unter AMS-Behandlung die Induktion einer Immuntoleranz zu erreichen wäre. Beide Fragestellungen wurden einmal bei einer genetisch verwandteren Anordnung (allogen: DB VI - Haut auf Sprague-Dawley Ratten) und zum anderen bei genetisch weiterer Entfernung (xenogen: Kaninchen - beziehungsweise Meerschweinchenhaut auf Sprague-Dawley Ratten) geprüft.

a) Prüfung der immunsuppressiven Wirkung

Die Abbildungen 6 und 7 zeigen die Ergebnisse der Prüfung einer immunsuppressiven Wirkung von AMS im Vergleich zu ALS und NKS und zu unbehandelten Kontrollen bei der allogenen Transplantation. Bei der Behandlung an den Tagen 1, 3 und 5 (Abb. 6) nach durchgeführter Transplantation mit je 2 ml Serum liegt die durchschnittliche Überlebenszeit der Transplantate für die mit AMS 2

behandelten Tiere bei $15,7 \pm 3,7$ Tagen, für die mit ALS behandelten bei $18,4 \pm 3,6$ Tagen und für unbehandelte Kontrollen bei $11,7 \pm 0,7$ Tagen.

In einer weiteren Serie (Abb. 7), bei der 7 Tage vor bis 2 Tage nach allogener Transplantation mit je 2 ml Serum pro Tag behandelt wurde, ergab sich eine mittlere Überlebenszeit für mit AMS 3 behandelte Tiere von $15,7 \pm 1,6$ Tagen, für mit ALS behandelte von $18,0 \pm 2,2$ Tagen, für mit NKS u behandelte von $15,2 \pm 1,1$ Tagen, für mit NKS behandelte von $12,4 \pm 0,8$ Tagen und für unbehandelte Kontrollen von $11,7 \pm 0,7$ Tagen.

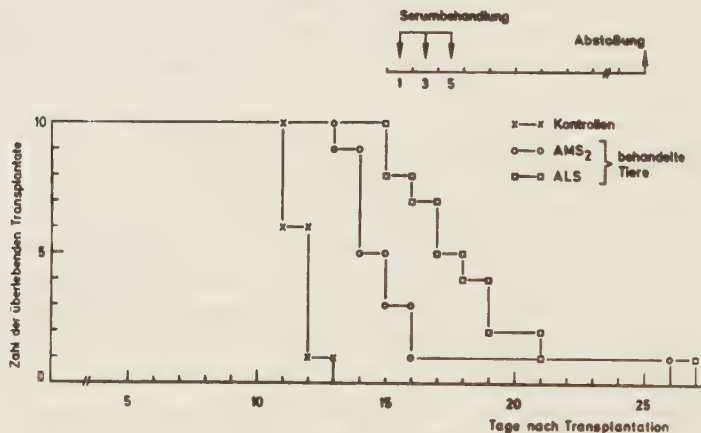


Abb. 6: Überlebenszeit von DB VI Hauttransplantaten bei Sprague-Dawley Ratten. Behandelte Empfängertiere erhielten je 2 ml AMS 2 oder ALS an den Tagen + 1, + 3 und + 5 nach Transplantation.

Es zeigt sich hier eine hoch signifikante Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit von mit AMS behandelten Tieren sowohl gegenüber mit NKS behandelten als auch gegenüber unbehandelten Kontrollen, wenn es in seiner Wirksamkeit auch deutlich hinter

der des ALS zurücksteht. Unabsorbiertes Normalkaninchenserum (NKS) verlängert ebenfalls die Überlebenszeit der Transplantate erheblich und reicht fast an die Wirkung des einmal mit Rattenerythrozyten absorbierten AMS heran, ein Effekt, der allerdings nach einmaliger Absorption mit Rattenerythrozyten weitgehend verloren geht.

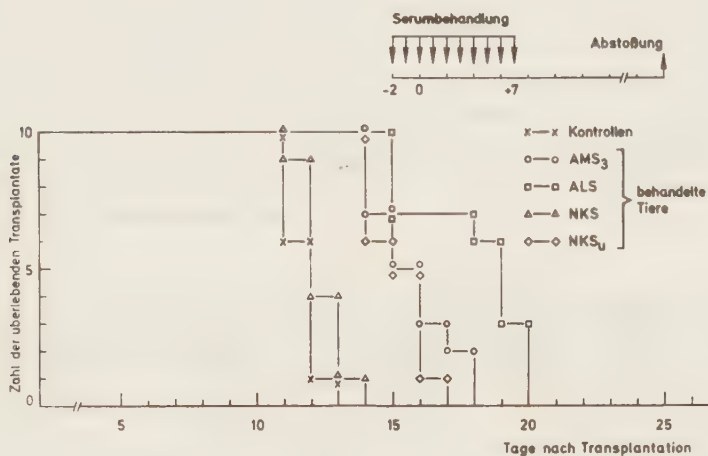


Abb. 7: Überlebenszeit von DB VI Hauttransplantaten bei Sprague-Dawley Ratten. Behandelte Empfängertiere erhielten je 2 ml AMS 3, ALS, NKS u oder NKS_u an den Tagen -7 bis +2.

Die Abbildungen 8, 9 und 10 zeigen die Untersuchungen zur immunsuppressiven Wirkung von AMS im Vergleich zu ALS, NKS und unbehandelten Kontrollen bei der xenogenen Transplantation.

Auch hier wurde wiederum einmal an den Tagen +1, +3 und +5 nach Transplantation mit je 2 ml Serum behandelt. In dieser Serie wurde Kaninchenohrhaut auf Sprague-Dawley Ratten übertragen. Die Überlebenszeiten waren (Abb. 8 und 9) für AMS₂ $20,3 \pm 5,6$ Tage, für AMS₃ $16,9 \pm 2,0$ Tage, für AMS_{3a} $15,6 \pm 1,6$ Tage, für ALS $14,0 \pm 1,3$ Tage, für ALS_a $11,4 \pm 0,8$ Tage, für NKS_u $12,9 \pm 0,7$

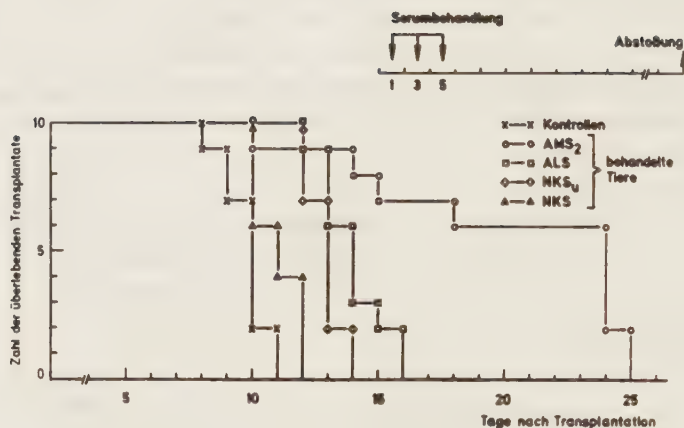


Abb. 8: Überlebenszeit von Kaninchenohrhauttransplantaten bei Sprague-Dawley Ratten. Behandelte Empfängertiere erhielten je 2 ml AMS 2, ALS, NKS u oder NKS an den Tagen +1, +3, +5 nach Transplantation.

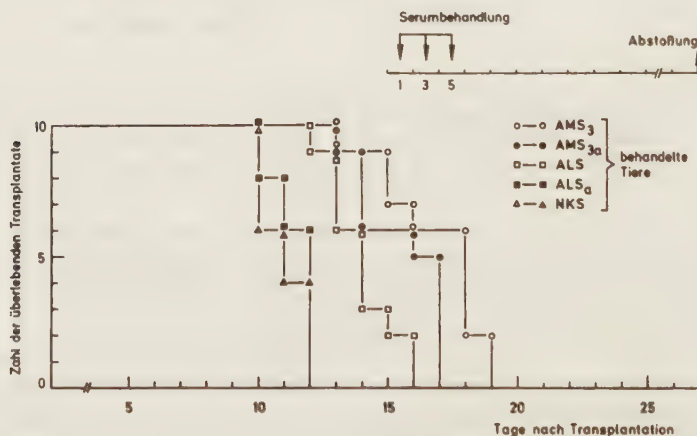


Abb. 9: Überlebenszeit von Kaninchenohrhauttransplantaten bei Sprague-Dawley Ratten. Behandelte Empfängertiere erhielten je 2 ml AMS 3, AMS_{3a}, ALS, ALS_a oder NKS an den Tagen +1, +3, +5 nach Transplantation.

Tage, für NKS $11,0 \pm 0,9$ Tage und für die unbehandelten Kontrollen $9,8 \pm 0,9$ Tage. AMS zeigt hier eine deutlich bessere Wirksamkeit als ALS, wobei die mit Charge 2, die sich allerdings als wesentlich wirkungsvoller als die Charge 3 erweist, behandelten Tiere eine hohe Signifikanz in der Verlängerung der Überlebenszeit der Xenotransplantate auch gegenüber mit ALS behandelten aufweisen. Die weitere Absorption mit Rattenlymphozyten bringt bei AMS nur eine unwesentliche Wirkungseinbuße, während die Wirkung des ALS danach völlig verloren scheint, da kein bemerkenswerter Unterschied zu mit NKS behandelten Tieren besteht. Auch hier zeigt sich eine geringe Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit bei Behandlung mit unabsorbiertem Normalkaninchenserum (NKS_u), die nach Absorption mit Rattenerythrozyten (NKS) weitgehend aufgehoben ist.

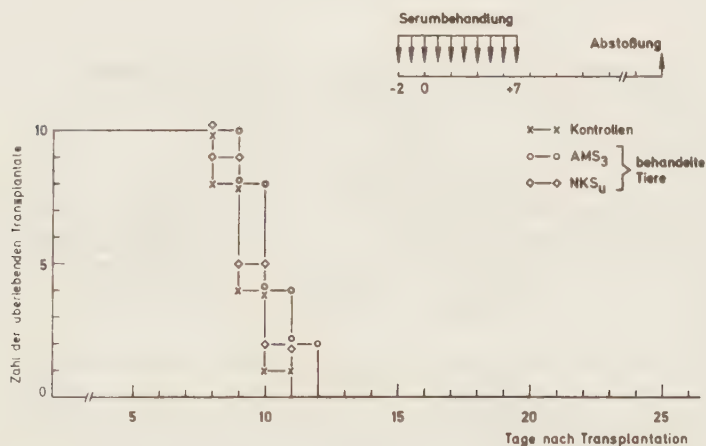


Abb. 10: Überlebenszeit von Meerschweinchenrückenhauttransplantaten bei Sprague-Dawley Ratten. Behandelte Empfänger-tiere erhielten je 2 ml AMS 3 oder NKS u an den Tagen -7 bis +2.

Im Gegensatz dazu zeigt sich bei Übertragung von Meerschweinchenrückenhaut auf Sprague-Dawley Ratten (Abb. 10) unter der Behandlung mit AMS 7 Tage vor bis 2 Tage nach Transplantation mit je 2 ml Serum pro Tag kein Transplantat verlängernder Effekt. Die Überlebenszeiten von mit AMS₃ behandelten Tieren liegen mit $10,4 \pm 1,1$ Tagen nur unwesentlich über den mit NKS_u behandelten ($9,6 \pm 1,0$ Tage) und den unbehandelten Kontrollen ($9,3 \pm 0,9$ Tage).

In Abb. 11 sind nochmals die Ergebnisse der Abbildungen 6 und 8 vergleichend dargestellt. Es kommt hier anschaulich zum Ausdruck, daß AMS eine größere Wirksamkeit in der Verlängerung von Kaninchenohrhauttransplantaten also im xenogenen Bereich aufweist, während ALS im allogenen Bereich wirkungsvoller ist, bei Xenotransplantaten in der Wirkung aber deutlich hinter der von AMS zurückbleibt.

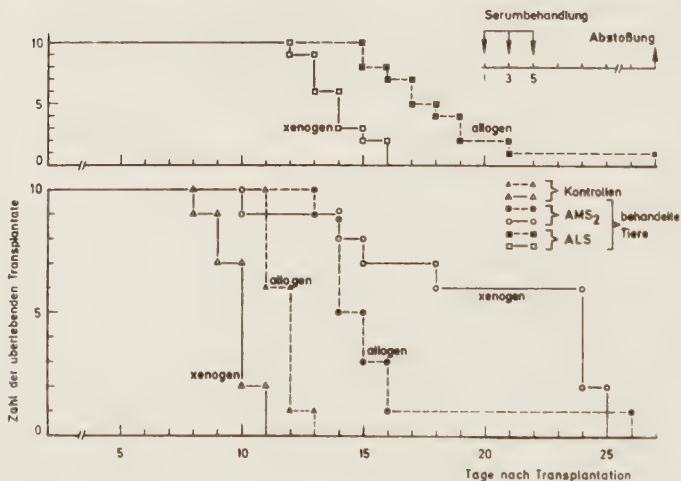


Abb.11: Überlebenszeit von DB VI Rückenhauttransplantaten und Kaninchenohrhauttransplantaten bei Sprague-Dawley Ratten. Behandelte Empfängertiere erhielten je 2 ml AMS 2 oder ALS an den Tagen +1, +3, +5 nach Transplantation.

b) Untersuchungen zur Toleranzinduktion

Da es unter Ausschaltung der Makrophagenfunktion möglicherweise zu einer Toleranzinduktion kommt, sollte geprüft werden, ob nach Milzzellengabe unter Behandlung mit AMS die Ausbildung eines Toleranzstadiums erreicht werden kann, das dann an Hauttransplantaten sichtbar gemacht werden sollte. Behandelt wurde mit je 2 ml Serum pro Tag 4 Tage vor bis 2 Tage nach Milzzellengabe. 14 Tage später folgte dieser die Transplantation genetisch gleicher Haut. Während oder nach der Transplantation wurde keine weitere Behandlung durchgeführt.

Im allogenen Bereich sollte gleichzeitig eine eventuelle Abhängigkeit von der verabreichten Antigenmenge geprüft werden. Hier wurden entsprechend zwei Gruppen gebildet, wobei die eine eine niedrigere Zahl Rattenmilzzellen erhielt, die andere eine um das hundertfache größere. Die dritte Gruppe lag im xenogenen Bereich.

Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der Gruppe, bei der 4×10^6 Rattenmilzzellen unter entsprechender Behandlung verabreicht wurden. Die Überlebenszeit der anschließenden Rattenhauttransplantate war in der mit AMS_1 behandelten Gruppe mit $18,2 \pm 1,9$ Tagen am stärksten verlängert. Unter Behandlung mit ALS zeigte sich eine Überlebenszeit von $16,2 \pm 1,9$ Tagen, die Kontrolltiere, die ohne jede Behandlung waren, hatten nach $10,0 \pm 0,8$ Tagen abgestoßen.

Die Ergebnisse der Gruppe, in der 4×10^8 Rattenmilzzellen gegeben wurden, zeigt Abb. 13. Hier ergab sich unter Behandlung mit AMS_1 keine Verlängerung der Überlebenszeit mit $10,0 \pm 0,8$ Tagen gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren mit $9,3 \pm 0,9$ Tagen. Die mit ALS behandelten Tiere zeigten dagegen eine mittlere Überlebenszeit von $22,3 \pm 3,4$ Tagen.

Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der xenogenen Untersuchungen. 5×10^7 Kaninchenmilzzellen wurden unter Serumbehandlung verabreicht und 14 Tage später Kaninchenohrhaut des gleichen Tieres

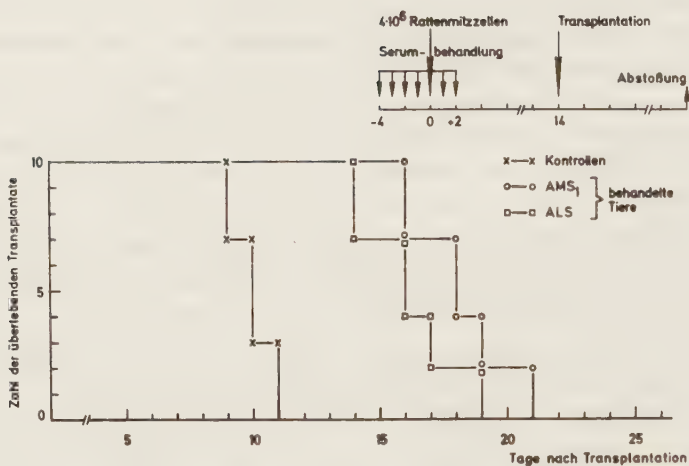


Abb. 12: Überlebenszeit von DB VI Hauttransplantaten bei Sprague-Dawley Ratten nach Vorbehandlung der Empfängertiere mit 4×10^6 DB VI Milzzellen. Behandlung mit je 2 ml AMS 1 oder ALS von Tag -4 bis +2. Tag 0 = Tag der Milzzellengabe, Hauttransplantation an Tag 14.

transplantiert. Die Überlebenszeit der Transplantate bei den mit AMS₂ behandelten Tieren war mit $16,6 \pm 1,4$ Tagen am längsten, die der mit ALS behandelten lag bei $14,8 \pm 3,0$ Tagen, während bei unbehandelten Tieren die transplantierte Haut bereits nach $8,1 \pm 0,9$ Tagen abgestoßen war.

3. Beeinflussung der Antikörperbildung gegen Schaferythrozyten

Die Beeinflussungsmöglichkeit der humoralen Antikörperbildung durch Behandlung mit AMS wurde geprüft, indem Ratten mit Schaferythrozyten immunisiert wurden. Gleichzeitig sollte auch hier untersucht werden, ob durch AMS möglicherweise die Toleranzinduktion zu erreichen wäre.

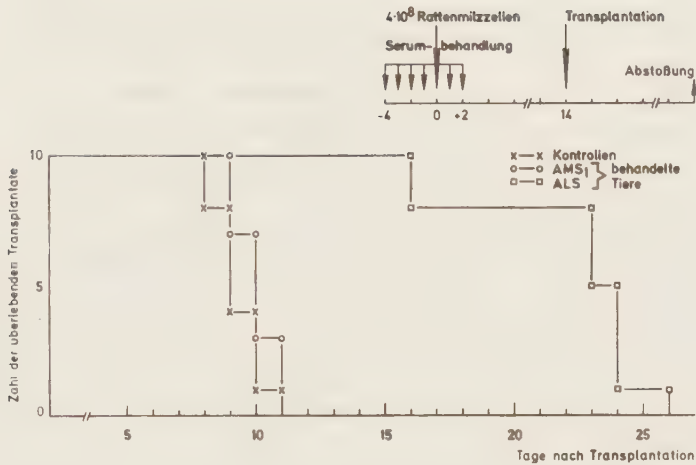


Abb. 13: Überlebenszeit von DB VI Hauttransplantaten bei Sprague-Dawley Ratten nach Vorbehandlung der Empfänger-tiere mit 4×10^8 DB VI Milzzellen. Behandlung mit je 2 ml AMS 1 oder ALS von Tag -4 bis +2. Tag 0 = Tag der Milzzellengabe, Hauttransplantation an Tag 14.

Es wurde deshalb zwei Tage vor bis 2 Tage nach einer ersten Antigengabe täglich mit 2 ml Serum behandelt und 14 Tage später eine Boosterinjektion gegeben. Um gleichzeitig noch eine Abhängigkeit von der verabreichten Antigenmenge zu prüfen, wurden drei Gruppen gebildet, die eine erhielt als erste Antigengabe 10^3 , eine zweite 10^5 und die dritte 10^7 Schafer erythrozyten. Die Boosterinjektion erfolgte 14 Tage später mit einer vollen Antigendosis von 10^8 Schafer erythrozyten.

Eine weitere Gruppe erhielt unter Behandlung mit ALS zuerst 10^7 und als Boosterinjektion 10^8 Schafer erythrozyten. Eine unbehandelte Kontrollgruppe erhielt zweimal 10^8 Schafer erythrozyten und eine weitere nur einmal 10^8 Schafer erythrozyten. Sieben Tage nach

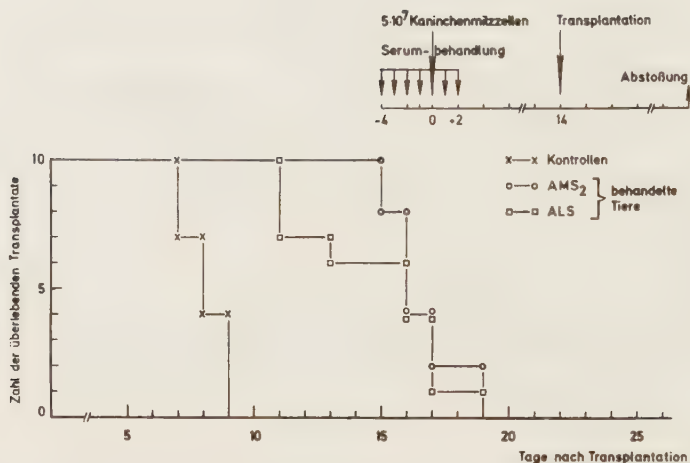


Abb. 14: Überlebenszeit von Kaninchenohrhauttransplantaten bei Sprague-Dawley Ratten nach Vorbehandlung der Empfängertiere mit 5×10^7 Kaninchenmilzzellen. Behandlung mit je 2 ml AMS 2 oder ALS von Tag -4 bis +2. Tag 0 = Tag der Milzzellengabe, Hauttransplantation an Tag 14.

der letzten Antigendosis wurden die Ratten entblutet und die Antikörpertiter durch Hämagglutinationstest bestimmt.

Die Ergebnisse zeigt Tabelle 7. Die geringste Antikörperbildung zeigt die mit ALS behandelte Gruppe. In den mit AMS behandelten Gruppen zeigen sich keine großen Unterschiede, wenn auch die Antikörperbildung von der 10^3 über die 10^5 zur 10^7 Gruppe geringgradig zunehmen. Insgesamt ist die Antikörperbildung gegenüber den unbehandelten Kontrollen noch wesentlich erniedrigt. Da die Gruppe, die nur einmal 10^8 Schaferthyrozyten erhielt, nach 7 Tagen bereits höhere Titer aufweist als alle mit Serum behandelten Gruppen, muß es sich um eine Serumwirkung handeln.

Tab. 7: Hämagglutinationstiter gegen Schafererythrozyten bei Sprague-Dawley Ratten. Behandelte Tiere erhielten je 2 ml AMS oder ALS an den Tagen -2 bis +2.

Tage	mit Serum behandelte Gruppen				Kontr.	Kontr.
-2 bis +2	AMS	AMS	AMS	ALS	Ø	Ø
0	10^7 SE*	10^5 SE	10^3 SE	10^7 SE	10^8 SE	Ø
14	10^8 SE	10^8 SE	10^8 SE	10^8 SE	10^8 SE	10^8 SE
21	Entbluten und Titerbestimmung					
	1 : 16	1 : 32	1 : 32	1 : 8	1 : 512	1 : 64
	1 : $\frac{32}{64}$	1 : 64	1 : 32	1 : 8	1 : 512	1 : 128
	1 : 64	1 : 64	1 : 64	1 : 16	1 : 512	1 : 256
	1 : $\frac{64}{128}$	1 : 64	1 : 64	1 : 16	1 : $\frac{512}{1024}$	1 : 256
	1 : 128	1 : 128	1 : 64	1 : 32	1 : 1024	1 : 256
	1 : 256	1 : 128	1 : 64	1 : 32	1 : 1024	1 : 256
	1 : 256	1 : 128	1 : 128	1 : 32	1 : 1024	1 : 512
	1 : 256	1 : 256	1 : 128	1 : 64	1 : 1024	1 : 512
	1 : 512	1 : 256	1 : 128	1 : 64	1 : 1024	1 : 512
	1 : 1024	1 : 256	1 : 256	1 : 128	1 : 1024	1 : 1024

* SE = Schafererythrozyten

D. DISKUSSION

I. Allgemeines

Die Diskussion um die Rolle der Makrophagen bei der Immunantwort auf Fremdsubstanzen hält an. Bereits 1899 wurde durch METCHNIKOFF (110) auf die Wichtigkeit dieser Zellen hingewiesen und mit der Herstellung eines Antiserums gegen Makrophagen eine wichtige Untersuchungsmethode beschrieben. Durch das zunehmende Interesse an der Durchführung von Organtransplantationen, aber auch durch Zunahme der Allergosen und Autoimmunerkrankungen und durch die Erkenntnis, daß bei Wachstum bösartiger Tumoren zumindest gelegentlich immunologische Prozesse mitspielen, ist es in den vergangenen Jahren zu vermehrten Untersuchungen über die Art des Immunmechanismus, das heißt die Möglichkeit eines Organismus auf Fremdsubstanzen durch Bildung von Abwehrkörpern spezifisch zu reagieren, gekommen. Nach Lage der Dinge wird eine über den Lymphweg oder Blutkreislauf in den Organismus gelangte antigene Substanz zunächst von Makrophagen aufgenommen und verarbeitet. Von diesen immunogenen Makrophagen, möglicherweise aber auch direkt durch das Antigen werden die kleinen Lymphozyten in die Lage versetzt, sich in die großen pyroninophilen Zellen (Immunoblasten) umzuwandeln. Diese können sich nun entweder durch Zellteilung zu Plasmazellen weiterentwickeln, die die humoralen Antikörper bilden (B-Lymphozyten), oder sie können durch Zellteilung wiederum kleine Lymphozyten, die sogenannten "Effektorzellen" bilden, die im Vorgang der Hypersensibilität vom verzögerten Typ die Eigenschaften von Antikörpern übernehmen (T-Lymphozyten).

1. Rolle der Makrophagen in der Immunantwort

Die möglichen Angriffspunkte der Makrophagen liegen einmal im afferenten Schenkel in der Aufnahme und Vorbereitung des Antigens, wobei zu unterscheiden ist, ob ein antigener Kontakt erstmals stattfindet (sogenannte Primärantwort) oder der Organismus nach bereits eingetretener Immunisierung auf einen erneuten antigenen Reiz reagiert (sogenannte Sekundärantwort). Des weiteren können Makrophagen im efferenten Schenkel durch unspezifisches Abräumen des durch humorale Antikörper oder Immunozyten spezi-

fisch geschädigten antigenen Materials wirksam sein. Möglicherweise kommt ihnen hier aber auch ein spezifischer zytotoxischer Effekt zu, den sie nach Aufnahme eines von Lymphozyten gebildeten Faktors entfalten können.

a) Wirkung der Makrophagen im afferenten Schenkel

aa) Bei der Primärantwort

In den Organismus eingebrachte Fremdsubstanzen, gleichgültig ob sie direkt in den Blutkreislauf gelangen oder sich zunächst im Gewebe befinden, werden kürzer oder später von den Makrophagen des Retikuloendothelialen Systems (RES) aufgenommen (157).

Dieser Vorgang der Phagozytose ist sehr wesentlich abhängig von der Art des Antigens. Generell kann gesagt werden, daß mit Zunahme der Teilchengröße und Abnahme der Löslichkeit des Antigens dessen Elimination und Aufnahme in Makrophagen beschleunigt ist (83). Zur Herausarbeitung der Aufgabe der Makrophagen in der Immunantwort wurden unter anderem Eiweißantigene wie Albumine vom Rind (BSA) (55,62,71,90,118), vom Ei (EA) (109) und vom Menschen (HSA) (77, 118, 144), Gammaglobuline vom Rind (BGG) (71, 109, 140), vom Menschen (HGG) (34, 75, 77) und vom Schwein (PGG) (145), Ferritin (142, 148), Hämoglobin von *Megathura creulata*, keyhole limpets (KLH) (61, 163, 164, 167, 168) und von *Maia squinado* (MSH) (10, 164, 165, 166, 167), Meerrettich Peroxydase (27), Phytohämagglutinin (PHA) (77, 80, 88), "purified protein derivat" (PPD) (29, 74, 80, 149) und synthetisches Polypeptid (138), die teils in löslicher, teils in aggregierter Form gegeben wurden, sowie heterologe Erythrozyten vom Esel (137), vom Küken (88) und vom Schaf (SRBC) (2, 4, 20,43, 63, 78, 82, 121, 125, 136, 137), Bakterien wie BCG (*Bacille-Calmette-Guérin*) (9, 73), Pneumokokken (6, 73), verschiedene Salmonellen (73, 88, 127) und *Shigella paradysenteriae* (43, 44, 60, 63, 78), Impfstoffe gegen bakterielle Infektionen wie Diphtherietoxoid (109, 148) und Tetanustoxoid (149), Bakteriophagen (8, 48, 49, 56, 66, 67, 90,161), Phagenrezeptorpartikel (85) und Viren (80) bei verschiedenen Versuchstieren verwendet. Der Nachweis der Phagozytose wird für die aufgeführten Antigene teils in vivo, teils in vitro erbracht. Eine Zelle ist in der Lage, zwei oder mehrere Antigene gleich-

zeitig aufzunehmen, die entweder gemeinsam oder unabhängig voneinander in unterschiedlichen Zeitabständen verabreicht werden (71, 142).

Nun scheint die Aufgabe der Makrophagen im Organismus mit der Phagozytose von Fremdsubstanzen, gefolgt vom Abbau des Antigens (27, 118, 126, 161, 163, 164, 166, 167, 168) in Teile, die die Zelle nach kürzerer Zeit verlassen und entweder ausgeschieden werden oder zur Synthese von Eigenmaterial dienen, nicht erschöpft zu sein. Obwohl den Makrophagen von einigen Autoren eine reine Aufräumfunktion zugeschrieben wird (88, 127, 136), ja, aus der geringeren Immunantwort nach Zugabe von Makrophagen zu einer Milzzellkultur (133) oder in vivo nach Erhöhung der Phagozytose durch gleichzeitige Verabreichung passiver Antikörper (4) oder auch nach Auslösen eines peritonealen Reizes mit Kalbserum (88) oder Glykogen (136) und anschließender Antigengabe sogar auf eine immunsuppressive Wirkung geschlossen wird, indem nämlich Makrophagen mit Lymphozyten um das Antigen konkurrieren und die Höhe der Immunantwort allein von dem direkt zu den immunkompetenten Lymphozyten gelangenden Antigen abhängig wäre, wird an anderer Stelle (85, 109) in vitro sogar die Antikörperbildung durch Makrophagen nachgewiesen. Die Antikörper, die nicht mit den üblichen humoralen Antikörpern der Lymphozyten übereinstimmen, treten nur in einer sehr frühen Phase auf und werden als Primitiv-, Notfalls- oder Sofortreaktion gedeutet. Dem Hinweis, daß phagozytierende Zellen Antikörper bilden und antikörperbildende Zellen phagozytieren können (125), steht entgegen, daß einmal humorale Antikörper von Makrophagen nicht gebildet werden können und andererseits Antigen nicht in den immunkompetenten Lymphozyten nachweisbar ist (128). Da es vielen Untersuchern gelang, mit sogenannten immunen Makrophagen, das heißt Makrophagen, die nach Antigenkontakt dieses in sich aufgenommen hatten, in gesunden Versuchstieren (2, 6, 34, 118, 135, 165, 166) beziehungsweise in vitro (29, 74, 75, 80, 82, 90, 166) eine Primärantwort auszulösen, wobei jeweils auf die Abwesenheit von freiem Antigen geachtet wurde, kann wohl als gesichert angenommen werden, daß von Makrophagen aufgenommenes Antigen nicht für die Auslösung der Immunantwort verloren ist. Viel

eher scheint das Antigen in Makrophagen möglicherweise in konzentrierter Form (10, 90, 165) zu den immunkompetenten Lymphozyten transportiert zu werden. Dabei kommt es in den Makrophagen bereits zu einer Vorbereitung des Antigens (10, 71, 78, 143), die auch ultrastrukturell nachweisbar ist (8), in eine für Lymphozyten akzeptable Form. Es handelt sich hierbei entweder um die Bildung einer spezifischen informativischen Ribonukleinsäure (RNS) (20, 48, 49, 50, 84, 85), welche die Aminosäuresequenz des in Lymphozyten zu bildenden Antikörpers festlegt oder um einen RNS-Antigen-Komplex (10, 56, 65, 66, 67, 138), wobei Teile des verarbeiteten Antigens an eine vorgebildete bei Antigenkontakt bereits vorhandene RNS gebunden werden, der die Antikörperbildung in Lymphozyten auslöst. Die RNS heterologer Makrophagen scheint ebenfalls wirksam zu sein (138). Die Tertiärstruktur des Antigens ist in diesen Komplexen jedenfalls nicht mehr nachweisbar (66). Die Bedeutung der RNS wird dadurch unterstrichen, daß nach Zwischenbehandlung der aus immunen Makrophagen extrahierten RNS oder des RNS-Antigen-Komplexes mit Ribonuklease die Antikörperbildung ausbleibt.

Für die Übergabe von RNS oder RNS-Antigen-Komplex ist ein direkter Zellkontakt zwischen Makrophagen und Lymphozyten erforderlich und bei in vitro-Untersuchungen nachgewiesen (29, 74, 75, 80, 150). Im ultrastrukturellen Bereich können Zytoplasmabrücken zwischen Makrophagen und Lymphozyten gezeigt werden (27), über die der Stoffaustausch stattfindet (9, 51, 107, 108, 148).

Andere Untersucher, die mit neugeborenen Versuchstieren arbeiten, zeigen ebenfalls die Wichtigkeit der Makrophagen bei der Auslösung der Immunantwort auf. Neugeborene sind noch nicht in der Lage, auf einen antigenen Reiz regelrecht zu reagieren. Werden den Neugeborenen jedoch vor oder gleichzeitig mit Antigengabe Erwachsenenmakrophagen eines Inzuchtstammes injiziert (3, 5, 24), kommt es zur Auslösung einer spezifischen Immunantwort. Die Unfähigkeit der Neugeborenen, auf einen antigenen Reiz durch Bildung spezifischer Antikörper zu reagieren, läge demnach in der Unreife der Makrophagen (3), in ihrer Unfähig-

keit fremdes Material als fremd zu erkennen (127) bei voller Funktionstüchtigkeit der immunkompetenten Lymphozyten begründet.

Ein ähnliches Modell läßt sich durch Schädigung von erwachsenen Versuchstieren durch Röntgenstrahlen herstellen. Während es bei Ganztierbestrahlung mit subletalen Dosen zu einer Schädigung des immunologischen Systems kommt, das nur durch Gabe von Makrophagen und Lymphozyten reparabel ist (44, 140, 165), wobei sowohl Makrophagen alleine (43, 44, 60, 140) als auch Lymphozyten alleine (60, 140) nicht ausreichen, kann durch Bestrahlung mit niedrigeren Dosen ein Stadium vergleichbar dem Neugeborenenstadium erreicht werden. Bei erhaltener Funktion der Lymphozyten kann diese Schädigung durch ausschließliche Gabe von Makrophagen gleichzeitig mit oder vor Antigenverabreichung oder auch durch Gabe von immunen Makrophagen aufgehoben werden (43, 44, 60, 63). Es zeigte sich bei derartigen Übertragungsversuchen, daß die Spendermakrophagen in der Leber und hauptsächlich in der Milz, die die Hauptstätte der Antikörperbildung ist, der Empfängertiere angereichert werden (145). Es müssen von den übertragenen Makrophagen mehrere Bedingungen erfüllt werden. Sie müssen lebend und intakt sein (2, 3, 29, 43, 74, 75, 118, 138). Werden sie nach Phagozytose des Antigens durch Bestrahlung geschädigt oder abgetötet, können sie noch eine geringere Antikörperbildung auslösen (165), während in vitro bestrahlte Makrophagen oder solche von mit niedrigen Röntgendosen bestrahlten Tieren gewonnene bei erhaltener Phagozytosefähigkeit hierzu nicht in der Lage sind (43, 44, 60, 118, 140). Es müssen autologe Makrophagen übertragen werden, um eine gute Wiederherstellung der Reaktionslage zu erreichen (29, 74). Während allogene Makrophagen noch eine geringe Wirksamkeit zu haben scheinen (5, 43, 118), sind xenogene sicher unbrauchbar (5). Außerdem muß sowohl bei Übertragungsversuchen (3, 5, 135) als auch in vitro (29, 82) ein bestimmtes Verhältnis zwischen Lymphozyten und Makrophagen vorhanden sein, um die größtmögliche Immunantwort zu erhalten. Bei Abweichung sowohl nach der einen als auch der anderen Seite kommt es zu einer Abschwächung bis hin zum Ausbleiben einer meßbaren Immunantwort und möglicherweise kann die oben beschrie-

bene immunsuppressive Wirkung nach Erhöhung der Makrophagenzahl in einer Milzzellkultur (133) oder nach Reizexudat (88, 136) als Mißverhältnis zwischen beiden Zellarten gedeutet werden.

Gleiche Eiweißantigene lösen in aggregierter Form, die auch heftiger phagozytiert wird, eine größere Immunantwort aus als in löslicher (61, 166). Das spricht ebenfalls für eine Beteiligung der Makrophagen im afferenten Schenkel der Immunantwort wie auch noch die Tatsache, daß Hauttransplantate in ihrer Überlebenszeit durch Gabe von "silica", einer spezifisch gegen Makrophagen wirksamen Substanz, 3 Tage bis 4 Stunden vor Transplantation verabreicht, verlängert werden können (134).

Insgesamt ist keine einheitliche Meinung über die Notwendigkeit und Nützlichkeit der Makrophagen im afferenten Schenkel der Immunantwort festzustellen. Während einige den Makrophagen hier keine Funktion zuordnen können (42, 68, 88, 136), meinen andere, daß die Phagozytose und die Katabolisierung des Antigens in Makrophagen durchaus nützlich, jedoch nicht unbedingt erforderlich sind (10, 34, 39, 77, 165), was bedeutet, daß eine Antikörperbildung auch ohne Makrophagen ablaufen kann. Eine dritte Gruppe findet, daß ohne Makrophagenfunktion keine Antikörperbildung auslösbar ist (55, 61, 80, 82, 85, 118, 172). Indem die Makrophagen den größten Teil des aufgenommenen Antigens abbauen, einen kleinen Teil jedoch über längere Zeit (118, 163, 164, 166), ja sogar Monate (62) behalten, das dann teils in hoch immunogener Form vorliegt (62, 161) teils an ihrer Oberfläche nachweisbar ist (126, 167, 168) und so zur Auslösung und Unterhaltung der Immunantwort durch Lymphozyten bereitsteht, wird ihnen ein Regelmechanismus der Höhe der Immunantwort zugeordnet (168).

Bei der Fülle der unterschiedlichen Ergebnisse scheint nur der Schluß zulässig, daß die Funktion der Makrophagen im afferenten Schenkel der Immunantwort nicht einheitlich, sondern von der Art des verabreichten Antigens abhängig ist (10, 43, 46, 63, 118, 163, 164). Für sogenannte weiche Eiweißantigene wie synthetisches Polypeptid, xenogene Albumine und Globuline, PPD und MSH ist die Mitwirkung der Makrophagen bei der Auslö-

sung der Immunantwort als erforderlich nachgewiesen (55, 71, 80, 138, 140), beziehungsweise findet sich nach Makrophagenkontakt zumindest eine stark erhöhte Immunogenität (10, 34, 90, 118, 149, 163, 164, 165). Bei einem harten Eiweißantigen wie KLH sind die Meinungen geteilt, einmal wird auch hier ihre unbedingte Mitwirkung nachgewiesen (61), während andere Untersucher finden, daß freies KLH immunogener als an Makrophagen gebundenes ist (163). Bei Phytohämagglutinin ist der Schritt durch Makrophagen nicht erforderlich (77, 80). Für Bakterienantigene (43, 44, 60, 63) und Bakteriophagen (48, 49, 50, 56, 67, 85, 161) scheint die Notwendigkeit der Makrophagenmitwirkung gesichert. Auch für xenogene Erythrozyten scheint sowohl in vivo (3, 5, 24) als auch in vitro (20, 53, 82, 121, 137, 152) der Nachweis erbracht, daß eine Primärantwort ohne Mitwirkung von Makrophagen nicht erfolgt. Diese Auffassung ist jedoch nicht unwidersprochen. Daß es nach Erzeugung eines Reizexudates und anschließender Antigengabe zu einer verminderten Antikörperbildung kommt (54, 136), könnte an dem Mißverhältnis zwischen Makrophagen und immunkompetenten Lymphozyten liegen, das, wie bereits oben erwähnt, zu verminderter Antikörperbildung führt.

Ebenso scheint das Argument, daß die Wiederherstellung der Reaktion auf Schafererythrozyten bei hoch bestrahlten Tieren allein mit Ductus thoracicus Lymphozyten gelingt (42), nicht stichhaltig, da an anderer Stelle (146) der Nachweis von Makrophagen in Ductus thoracicus Lymphe erbracht wird. Hier könnten also diese Makrophagen beteiligt sein. Schwieriger ist eine Deutung bei Makrophagenübertragung auf mit niedrigen Röntgendosen bestrahlte Tiere, wodurch bei anderen Antigenen wie *Shigella paradysenteriae* die volle Reaktionslage wiederhergestellt wird, bei Schafererythrozyten die Antikörperbildung jedoch ausbleibt (43, 63).

bb) Bei der Sekundärantwort

Obwohl das immunologische Gedächtnis den Lymphozyten (42, 116, 127, 137, 149) zugeschrieben werden muß, scheinen die Makrophagen auch hier ihre Bedeutung zu haben. Zunächst wird das

Antigen auch hier von Makrophagen phagozytiert (142, 165), welcher Vorgang bei wiederholter Antigengabe sogar beschleunigt sein kann (127, 149). Durch Gabe immuner Makrophagen kann auch eine Sekundärantwort ausgelöst werden (29, 75, 165). Die Bildung von RNS-Antigen-Komplexen und ihre Weitergabe an immunkompetente Lymphozyten ist hier ebenfalls nachgewiesen (10, 62). Obwohl durch Zwischenschaltung von Makrophagen in der Sekundärantwort in einigen Fällen eine Erhöhung der Immunantwort zu erreichen ist (75, 116, 149, 165), scheint ihre Wirkung hier nicht so wichtig zu sein, da generell auch ohne sie, also durch direkten Kontakt von Antigen mit sensibilisierten Lymphozyten eine Sekundärantwort auslösbar ist (21, 29, 42, 75, 79, 116, 118, 137, 149, 165).

b) Wirkung der Makrophagen im efferenten Schenkel

Nach erfolgter Antikörperbildung, aber auch bei Verabreichung passiver Antikörper gleichzeitig mit Antigengabe (4), kommt den Makrophagen eine weitere Aufgabe bei der Abstoßungsreaktion von Fremdeiweiß, also in einer späteren Phase der Immunantwort zu.

Durch passive Antikörper geschädigte Schafererythrozyten werden bei Mäusen phagozytiert und abgebaut, ohne daß es zu einer Immunantwort (4, 136) käme. Bei der Tuberkulinreaktion, einer zellulären Reaktion vom verzögerten Typ, konnte von verschiedenen Untersuchern die Mitwirkung der Makrophagen im efferenten Schenkel nachgewiesen werden (14, 38, 39, 79, 158). Durch lokale Anwendung eines Antimakrophagenserums (79) kann die Hautreaktion vermindert werden. Makrophagen werden von Lymphozyten mit einem spezifischen Antikörper ausgerüstet (14, 38, 39, 158) und bewirken so gemeinsam mit den Effektorzellen am Zielort die Hautreaktion. Es handelt sich dabei um einen spezifischen Faktor (MCF = macrophage cytotoxicity factor), der von T-Lymphozyten in Anwesenheit von Antigen gebildet nur in Verbindung mit Makrophagen wirksam ist. Die Makrophagen werden bei dieser Abstoßungsreaktion nicht abgetötet und behalten ihre volle funktionelle Kapazität (102). Die spezifische Wirkung immuner Makrophagen gegen Zielzellen ist nachweis-

bar (70), wobei es dann zum Absterben beider Zellen kommt. Auch bei Hauttransplantaten ist die Mitwirkung der Makrophagen im Abstoßungsprozeß erwiesen (134, 135, 153). Bei ultrastrukturellen Untersuchungen finden sich Makrophagen (153) neben den Effektorzellen, die ebenfalls wesentlich bei der Abstoßung von Hauttransplantaten mitwirken (68, 69). Durch Verabreichung von "silica" 5 Tage nach Hauttransplantation läßt sich die Überlebenszeit der Transplantate signifikant verlängern (134). Dies zeigt ebenso die Wichtigkeit der Makrophagen wie die Übertragung immuner Makrophagen, die bei den Empfängertieren die vorzeitige Abstoßung der Hauttransplantate bewirken (135), wobei es sich um eine spezifische Wirkung handelt.

2. Aufgabe der Makrophagen bei der Toleranzinduktion

Unter Immuntoleranz versteht man einen Zustand reduzierter oder fehlender Reaktivität eines Organismus gegenüber einer spezifischen antigenen Substanz, die normalerweise eine Immunreaktion auslösen würde. Ein Toleranzstadium kann bei Versuchstieren auf verschiedene Weise erreicht werden (92, 126). Bei neugeborenen Tieren ist das Immunsystem noch nicht vollständig ausgereift. Sie sind nicht in der Lage, auf einen antigenen Reiz durch Bildung spezifischer Antikörper zu reagieren (3, 5, 24). Vielmehr bleibt der Reiz unbeantwortet, die Immunantwort bleibt aus. Wird nun der Reiz mit dem gleichen Antigen in regelmäßigen Abständen wiederholt, so bleibt auch dieser, auch noch zu Zeiten, wo das Versuchstier die volle immunologische Reife erlangt hat, unbeantwortet, es liegt eine Immuntoleranz vor. Die Tatsache konnte für Eiweißantigene wie HGG (36), BGG (76) und Geißelantigene von *Salmonella adelaide* (127, 129) ebenso nachgewiesen werden wie für Milzzellen (1), wobei die für Milzzellen toleranten Tiere später auch Hauttransplantate des gleichen Spenders tolerieren. Eine dem Neugeborenenstadium vergleichbare Reaktionslage läßt sich durch niedrige Röntgenbestrahlung erwachsener Versuchstiere erreichen (43, 44, 91). Bei erwachsenen Tieren läßt sich Toleranz auch noch durch sehr niedrige oder sehr hohe Antigenmengen erzeugen (172). Zur Erreichung der Toleranz mit sehr

niedrigen Antigendosen ist lösliches Antigen, das nicht durch Aggregate verunreinigt ist, erforderlich. Diese Reinigung ist entweder durch Zentrifugieren (11), Ultrazentrifugieren (99) oder auch durch Tierpassage, wobei die aggregierten Teilchen phagozytiert werden und der lösliche Antigenanteil aus dem Serum des filtrierenden Tieres zu gewinnen ist (55), durchführbar. Auf diese Weise wurden Toleranzen für HGG (11,36), BSA (36, 55, 115), Truthahngammaglobulin (36) und Pferdegammaglobulin (99) erzeugt. Daß auch mit sehr großen Antigenmengen ein Toleranzstadium erreichbar ist, wurde für BSA (115) nachgewiesen. Außerdem ließ sich Toleranz durch Gabe passiver Antikörper 24 Stunden vor der ersten von wiederholten Schaferythrozyteninjektionen für diese (123) und für Hauttransplantate eines Elternteils durch wiederholte i.v.-Injektionen von Spendermilzzellen (25) erzeugen.

Generell gilt, die Immuntoleranz ist spezifisch (25, 99, 115), sie gilt jeweils nur für das Agens, mit dem sie erzeugt wurde. Das Toleranzstadium ist zeitlich begrenzt und vergeht einige Zeit, nachdem das tolerogene Antigen ausbleibt (36). Die für die Immuntoleranz verantwortliche Zelle ist der Lymphozyt (69, 76, 117), denn (a) das Toleranzstadium läßt sich durch Lymphozyten, nicht jedoch durch Makrophagen auf hochbestrahlte Tiere übertragen (1, 36), (b) durch immune Makrophagen läßt sich die Toleranz nicht überwinden, das heißt in toleranten Tieren keine Antikörperbildung auslösen (118) und (c) die Makrophagen toleranter Tiere reagieren normal (76, 118, 127), sie phagozytieren und bauen das Antigen ab und sind als immune Makrophagen in der Lage, bei Normaltieren Antikörperbildung auszulösen.

Wenn auch den Makrophagen bei der Unterhaltung des Toleranzstadiums keine Aufgabe zufällt, so sind sie doch bei dessen Auslösung ursächlich beteiligt (45). Sowohl bei neugeborenen als auch bei mit Röntgenstrahlen behandelten erwachsenen Versuchstieren konnte der Fehler im Immunstatus als mangelnde Reife beziehungsweise Schädigung der Makrophagen entdeckt werden. Kleinste Mengen eines hochgereinigten, löslichen

Antigens werden von Makrophagen nicht phagozytiert, es wird hier fremdes Material möglicherweise nicht als solches erkannt (11). Bei Gaben von passiven Antikörpern mag es ebenso sein, daß maskiertes Antigen nicht als fremd erkannt wird. Bei Toleranzerzeugung durch sehr hohe Antigenmengen ist eine Deutung schon schwerer und folgt man der Vorstellung, daß es zur Toleranzinduktion kommt, wenn Antigen die immunkompetenten Lymphozyten direkt erreicht, bevor sie über Makrophagen eine Information zur Antikörperbildung erhalten (22, 117, 129), nur in der Annahme vorstellbar, daß die Makrophagenfunktion bei einem Überangebot von Antigen gestört wird, indem entweder die Phagozytoserate abnimmt oder indem die weiteren Aufgaben, der Abbau des Antigens und die Bereitstellung einer Information für immunkompetente Lymphozyten, durch überhöhte Phagozytose behindert werden, und deshalb das im Kreislauf befindliche freie Antigen die überwiegende Zahl der immunkompetenten Lymphozyten erreichen kann.

3. Die Makrophagen - eine einheitliche Zellart

Über die Herkunft und Verwandtschaft der verschiedenen im Organismus vorkommenden Makrophagen bestand lange Zeit keine Übereinstimmung. Neuerdings scheint es jedoch erwiesen, daß alle phagozytierenden Zellen des RES-Blutmonozyten, Peritonealmakrophagen, Makrophagen der Entzündungsreaktion, Kupffer'sche Zellen der Leber, Retikulumzellen der Milz und Lymphknoten, Mikroglia des Zentralnervensystems und Alveolarmakrophagen - eine gemeinsame Stammzelle im Knochenmark haben, die Promonozyten, die ihrerseits Tochterzellen der neutrophilen Myelozyten sind (59, 100). Vor allem durch radioaktive Markierung läßt sich zeigen, daß es sich bei den Promonozyten um eine rasch vermehrende Zellart (57, 146, 169, 170) handelt, wobei aus einer Teilung entweder je ein wieder teilungsfähiger Promonozyt und ein Monozyt (146) oder zwei Monozyten (58) hervorgehen. Die Monozyten werden ins Blut abgegeben und bilden das Reservoir für alle Gewebsmakrophagen (57, 100), wie sich nach weiterer Verfolgung der markierten Zellen feststellen läßt. Die Blutmonozyten haben eine kurze Halbwertszeit, die unter Nor-

malbedingungen zwischen einem und drei Tagen liegt (57, 146, 174). Sie scheinen sich ebenso wie die aus ihnen hervorgegangenen Gewebsmakrophagen normalerweise nicht mehr zu teilen (41, 58, 170), behalten diese Fähigkeit jedoch, wie sich nach bestimmten Reizen zeigen läßt (13, 146), ja sie scheinen eine gewisse Pluripotenz zu behalten, wie bei Milzmakrophagenübertragung auf letal bestrahlte Tiere (171) oder Peritonealmakrophagenübertragung (145) nachgewiesen wird, wobei diese übertragenen Zellarten zumindest Teile des RES ersetzen können. Auch wurde für Peritonealmakrophagen das Einwandern in Milzsinusoide nachgewiesen (83). Nach Verlassen der Blutbahn und Einwandern in die Gewebe kommt es zur Weiterentwicklung der Monozyten in für die bestimmten Organe spezifische Makrophagen (41, 64, 103, 104, 124, 155, 169, 170, 171). Diese Weiterentwicklung zeigt sich in bestimmten morphologischen und zytochemischen Veränderungen, die auch bei in vitro-Kultivierung von Blutmonozyten zu beobachten sind (16, 31, 74) und scheinen eine Vergrößerung des metabolischen und funktionellen Potentials zu beinhalten.

Obwohl es aus morphologischen Untersuchungen von Lymphozytenkulturen Hinweise dafür gibt, daß sich möglicherweise auch aus diesen Zellen Makrophagen bilden können (26, 33), wird diese Entwicklungsreihe nach neueren in vivo-Untersuchungen ausdrücklich ausgeschlossen (57, 146, 155, 170, 171).

II. Zur Herstellung des Antimakrophagenserums

Wird bei der Herstellung von Antimakrophagenseren das Ziel verfolgt, die Aufgabe der Makrophagen im Immunmechanismus zu untersuchen und durch Anwendung solcher Seren möglicherweise eine Immunsuppression auszulösen, so muß eine hohe Anforderung an die Spezifität der hergestellten Seren gestellt werden. Wegen der bekannten Mitwirkung der Lymphozyten bei der Immunantwort und der nachgewiesenen immunsuppressiven Wirkung von Antilymphozytenserum ist besonders auf die Abwesenheit antilymphozytärer Antikörper in den Antimakrophagenseren zu achten. Bei Verwendung von Peritonealexudat, das regelmäßig auch Lymphozyten enthält, zur Immunisierung, kann nicht mit der Gewinnung eines spezifischen, von gegen Lymphozyten kreuzreagierenden Antikörpern freien Antimakrophagenserums gerechnet werden, es wird sich immer um ein Antiperitonealzells Serum handeln, das Antikörper gegen mehrere Zellarten enthält, möglicherweise entsprechend ihrem Anteil im Immunisierungsmaterial. Die Primärforderung zur Herstellung spezifischer Antimakrophagenseren wäre demnach, die Immunisierung nur mit reiner Makrophagensuspension durchzuführen.

Möglichkeiten der Reingewinnung von Monozyten aus dem peripheren Blut (16, 29, 52, 80, 141) und von Alveolarmakrophagen (9, 17, 79, 133, 149) sind angegeben. Da zur Serumherstellung größere Zellzahlen in mehreren, relativ kurz aufeinanderfolgenden Zeitabständen gebraucht werden, wird man ein technisch möglichst wenig aufwendiges Vorgehen wählen. Wegen der leichteren Gewinnung werden deshalb überwiegend Peritonealmakrophagen verwendet. Diese werden teils ohne Reiz (26, 81, 87, 118, 168) gewonnen, teils mit verschiedenen Mitteln in der Peritonealhöhle angereichert, wobei sowohl die Gesamtzellzahl als auch der prozentuale Anteil der Makrophagen vergrößert werden soll. Am häufigsten wird "Thioglycollate Medium" (Difco^o) angewendet (2,4,5,6,7,34,35, 40, 44, 60, 61, 63, 91, 118, 134), wo sich bei Mäusen nach 3-7 Tagen die Zellzahl auf $5-20 \times 10^6$ erhöht und der Anteil der Makrophagen mit 60-90 % bei 4-17% Lymphozyten angegeben wird.

Bei Mäusen finden sich im normalen Peritonealexudat (26, 118, 168) $0,5 - 5 \times 10^6$ Zellen bei 40-60 % Makrophagen und 35 % Lymphozyten. Eine weitere Möglichkeit des peritonealen Reizes für Mäuse aber auch für Ratten ist in der Verabreichung von "Proteose Peptone" (Difco^o) beschrieben (10, 20, 28, 48, 86, 118, 132, 162, 163, 165, 166, 167, 168), womit auch wir unser Reizexudat gewannen, wobei der Reiz nach FISHMAN (48) mit "Beaf heart infusion broth" (Difco^o) verstärkt wurde. Nach "Proteose Peptone (Difco^o) werden bei Ratten vier Tage nach Reiz ca 25×10^6 Zellen bei 80-90 % Makrophagen gefunden, während wir zwei Tage nach verstärktem Reiz $80-90 \times 10^6$ Zellen mit einem Makrophagenanteil von 55 - 60 % gewannen. Möglicherweise hätte sich durch zusätzliches zweitägiges Warten auch bei uns ein höherer Makrophagenanteil ergeben, wofür vor allem der mit 10-12 % relativ hohe Granulozytenanteil spricht, der allgemein nicht gefunden wird, wahrscheinlicher liegt es jedoch an der gleichzeitigen Verabreichung von "Beaf heart infusion broth" (Difco^o), wodurch die Gesamtzellzahl immerhin um das 3-4fache gesteigert werden konnte, wenn auch auf Kosten des um ein Drittel verminderten prozentualen Makrophagenanteils. Vielleicht lassen sich auch mit der von uns verwendeten Tierart nicht so hohe Makrophagenanteile erzielen. Als weitere Reizmittel werden Glykogen (133, 136, 169), Stärke (149) und verschiedene Öle (8, 27, 66, 67, 72, 101, 105, 109, 139, 140) angegeben, die vorwiegend bei größeren Versuchstieren wie Meerschweinchen und Kaninchen Verwendung finden und mit denen auch ähnliche Zellzahlen erreicht werden.

In Tabelle 8 sind die Verfahren angegeben, die bisher bei der Herstellung von Antimakrophagenserum gebraucht wurden. Während eine Reihe Untersucher (7, 28, 35, 40, 72, 132, 154) mit Peritonealexudat immunisieren und damit ein gegen mehrere Zellarten gerichtetes Immunserum herstellen, bemühen sich andere (81, 86, 87, 101, 105, 139, 162) um eine weitere Anreicherung der Makrophagen. Dabei wird ausschließlich die Fähigkeit der Makrophagen benutzt, sich unter bestimmten Bedingungen an Glas anzuheften, die andere Zellen nicht haben. Nach dieser Methode gelingt es,

Tab. 8: Gewinnung und Vorbereitung des Immunisierungsmaterials bei hergestellten Antimakrophagenseren mit prozentualer Angabe des Makrophagenanteils.
(Leere Felder bedeuten fehlende Angaben).

Unter- sucher	*verwendete Makrophagen	Peritoneal- reiz mit	Zellge- winnung nach	Vorbe- reitung	Zellanteil in % Makro- Lympho- phagen zysten	
7	peritoneal	Thioglycol- late Medium	7 Tage	keine	86	
28	peritoneal	Proteose Peptone	10 Minuten			
35	peritoneal	Thioglycol- late Medium	4 Tage		85-95	
40	peritoneal	Thioglycol- late Medium	6-7 Tage		86	
72	peritoneal	Paraffinöl	6 Tage	keine		
79	alveolar					
81	peritoneal	kein Reiz		Kultur	95	
87	peritoneal	kein Reiz		Kultur		
95 96 98	peritoneal	Beaf heart + Proteose Peptone	2 Tage	Inkub. mit ALS	85-90	5 (Zell- trümmer)
101	peritoneal	Paraffinöl	4 Tage	Kultur	90	
105	peritoneal	Paraffinöl	3 Tage	Kultur	100	
132	peritoneal	Proteose Peptone	10 Minuten		80-85	10-15
139	peritoneal	Mineralöl	4 Tage	Kultur	93	2
154	peritoneal					
162 86	peritoneal	Proteose Peptone	3-4 Tage	Kultur	100	

* Nummer des Literaturverzeichnisses.

Tab. 9: Immunisierungsweisen bei hergestellten Antimakrophagenseren mit Angabe der verwendeten Zellzahlen.
(Leere Felder bedeuten fehlende Angaben).

Untersucher *	Anzahl hergest. Chargen	Anzahl der Injektionen	Abstand der Injektionen in Tagen	verabreichte Zellzahl	Weg der Eingabe	Serumgewinnung Tage nach der letzten Inj.
7		3	14	$1-10 \times 10^8$	i. v.	7
28	1. 2.	12	2-3	5×10^6 5×10^7		
35	1. 2.	5-8		$10-13 \times 10^6$ $4-13 \times 10^6$	i. v. s. c. + Freund Adj.	8-13
40	1. 2. 3.	2	14	4×10^8 5×10^8 10^8 7×10^8	1. Inj. s. c. + Freund Adj. 2. Inj. i. v. i. v. i. v.	14
72		9	7	8×10^9	i. v.	10
79		8	3-4	$2-3 \times 10^7$	i. v.	7
81		2	14	4×10^6	i. v.	7
87		10	3-4	10^7	i. v.	
95, 96, 98		6	3-4	$1-3 \times 10^8$	i. p.	6
101		3	7	10^7	1. Inj. s. c. + Freund Adj. dann i. v.	7-10
105		4	7	5×10^7	1. Inj. i. m. + Freund Adj. dann i. m.	7
132		12	2-3	10^7		
139		10	2-3	10^6 10^5	1. Inj. i. m. + Freund Adj. dann i. m.	7
162	1.	2	14	3×10^6	s. c. + Freund Adj.	28
86	2.	9	3	$1,1 \times 10^6$	i. v.	8

* Nummer des Literaturverzeichnisses

eine Zellsuspension herzustellen, in der 90 - 100 % Makrophagen enthalten sind. Eine weitere Möglichkeit der Reingewinnung von Makrophagen aus dem Peritonealzellexudat besteht in der Anwendung eines Isoimmunserums (15), das aber ebenso wie die Zellkultur ein relativ aufwendiges Verfahren bedeutet. Die Anreicherung der Zellen unter Verwendung eines Antilymphozytenserums, wie wir sie erstmals anwenden, bedeutet demgegenüber eine wesentliche Vereinfachung der Methoden. Das gesammelte Peritonealzellexudat wird lediglich für zwei Stunden mit Antilymphozytenserum unter Anwesenheit von Komplement bei 37° C inkubiert, womit eine Anreicherung der Makrophagen auf 85 - 90 % gelingt. Es kann am gleichen Tag zur Immunisierung verwendet werden. Außerdem können auf diese Weise relativ einfach Suspensionen mit großen Zellzahlen gewonnen werden. Vergleicht man in Tabelle 9, die einen Überblick über die gebrauchten Immunisierungsweisen gibt, unsere zur Immunisierung verwendete Zellzahl mit denen, die eine Anreicherung des Makrophagenanteils mittels Kultur durchführten, so ergibt sich, daß wir unsere Empfängertiere mit einer 6 bis 100 fachen Makrophagenzahl immunisierten. Als Nachteil mag ein relativ hoher Anteil an Granulozyten (10 %) gelten und vor allem die noch im Immunisierungsmaterial vorhandenen Lymphozytentrümmer, die sich nicht vollständig auswaschen ließen. Unter der Vorstellung, daß sich durch gleichzeitige Verabreichung passiver antilymphozytärer Antikörper die begleitende Immunantwort auf lymphozytenspezifische Antikörper unterbinden ließe, wie sie bei UHR (159) und ROWLEY und FITCH (147) angegeben ist und von anderen Untersuchern bestätigt wird (4, 47, 93, 119, 123, 160, 175) wurde deshalb gleichzeitig mit dem Immunisierungsmaterial regelmäßig ein Antirattenlymphozytenserum verabreicht.

Es war deshalb zu hoffen, daß sich mit der von uns erstmals durchgeführten neuen Methode der Gewinnung des Immunisierungsmaterials und Immunisierung unter gleichzeitiger Verabreichung passiver, gegen Lymphozyten gerichteter Antikörper bei Verwendung sehr hoher Zellzahlen nicht nur ein sehr spezifisches, nur gegen Makrophagen gerichtetes, sondern auch hoch potentes Immunserum herstellen ließe.

III. Eigenschaften der hergestellten Antimakrophagenseren

Bei Prüfung der Wirksamkeit der gebrauchten Seren wird sich das Hauptaugenmerk wiederum auf die Spezifität der Seren und hier besonders auf die Kreuzreaktivität der Antimakrophagenantikörper mit Lymphozyten richten. Wegen der bekannten Mitwirkung der Lymphozyten sowohl bei der humoralen Antikörperbildung als auch der zellulären Immunabwehr und der nachgewiesenen immunsuppressiven Wirkung hergestellter Antilymphozytenserum geht die Hauptfrage dahin, ob bei Makrophagen und Lymphozyten unterschiedliche antigene Muster vorliegen oder ob bei Vorhandensein gleichartiger antigenen Muster Antimakrophagenseren notwendigerweise mit Lymphozyten und umgekehrt Antilymphozytenserum mit Makrophagen kreuzreagieren müssen. Die durchgeführten serologischen Untersuchungen sprechen ebenso wie der Befund, daß es nach Absorption der Antimakrophagenseren mit Rattenlymphozyten zu keinem Wirkungsabfall kommt, für das Bestehen eines eigenen, makrophagenspezifischen Antigenmusters, gegen das sich spezifische Antikörper bilden können. Zu dem gleichen Ergebnis kamen MARSMAN, VAN DER HART und VAN LOGHEM (105), die in ihrem AMS nach Absorption mit Lymphozyten für Makrophagen spezifische Antikörper nachweisen. So scheint es nicht mehr zulässig von einer Kreuzreaktion hergestellter Antimakrophagenseren mit Lymphozyten oder Antilymphozytenserum mit Makrophagen, wie sie unter anderem bei BARTH et al. (12) gefunden wird, zu sprechen, vielmehr scheint es sich jeweils entsprechend der Immunisierungsweise bei Herstellung eines gewünschten Antiserums um gleichzeitige Produktion eines weniger potenten unerwünschten Antiserums, als Folge einer Verunreinigung im Immunisierungsmaterial zu handeln.

Die nähere Spezifizierung der hergestellten Antimakrophagenseren erfolgte an bewährten immunologischen Testmethoden.

a) Obwohl die Höhe der Antikörpertiter nicht unbedingt mit der Wirksamkeit eines Antiserums korreliert, stellt die serologische Spezifizierung eine gute Methode dar, insbesondere mehrere in einem Serum vorhandene Antikörper qualitativ und quantitativ zu identifizieren. Tabelle 10 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse serologischer Untersuchungen von hergestellten Antimakrophagenseren, wobei agglutinierende (35, 101, 105, 139) und zytotoxische (40, 72, 79, 87, 101, 105, 132, 154, 162) Antimakrophagenantikörpertiter wie auch Antikörpertiter für Lymphozyten (35, 40, 72, 79, 87, 105, 132, 154) und Erythrozyten (35, 87, 139) bestimmt wurden. Gleichzeitig wird mit verschiedenen Absorptionen die Spezifität der einzelnen gewonnenen Antikörper dokumentiert.

Es zeigt sich, daß überwiegend niedrigtitrige Antimakrophagenseren hergestellt wurden, die antilymphozytäre Antikörper in unterschiedlicher Menge enthalten, wobei die Vorbereitung des Immunisierungsmaterials mit Anreicherung von Makrophagen voll an Bedeutung gewinnt. Bei Verwendung von Peritonealzellexudat zur Immunisierung (40, 72, 132, 154) werden regelmäßig auch wesentliche Mengen antilymphozytärer Antikörper gebildet. Es konnten aber auch höhertitrige Antimakrophagenseren hergestellt werden (35, 79, 105, 139), die entweder kaum antilymphozytäre Antikörper enthielten (79) oder deren geringe Menge sich durch Absorption mit Lymphozyten ohne Beeinflussung des Antimakrophagenantikörpertiters vollständig entfernen ließ (105). Fraglich scheint lediglich das Ergebnis von DESPONT und CRUCHAUD (35), die Peritonealzellen ohne weitere Anreicherung der Makrophagen zur Immunisierung verwendeten und ohne jede Absorption für Lymphozyten nur einen Antikörpertiter von 1 : 4 bei sehr hohem Antimakrophagenantikörpertiter von 1 : 4096 fanden.

Für die Wirksamkeit der hergestellten Seren scheint der Immunisierungsweg eine größere Bedeutung zu haben. Bei intramuskulärer Gabe der Zellsuspension, wobei der ersten Injektion Freund'sches Adjuvans zugesetzt war, ließen sich selbst bei Verwendung kleinerer Zellzahlen die höchstitrigen Seren gewinnen (105, 139),

Unter- sucher	Spezifi- *zierung der Serum	Absorption mit	Antikörper gegen			
			Erythrozyten		Makrophagen	
			aggl.	zytot.	aggl.	zytot.
35	NKS		Ø		1:1	Ø
	KAMaMS		1:2048		1:4096	1:4
	KAMaMS	MaEry	1:32		1:2048	
72	PARMS				1:64	1:32
	PARMS	REry			1:32	1:16
	PARMS	REry+Le			1:16	1:8
	PARTS				1:16	1:128
	PARTS	REry			1:4	1:16
	PARTS	REry+Le			1:1	1:2
79	KAMeMS	Sc+MeEry			1:512	1:4
	KAMeLS	Sc+MeEry1			1:16	1:28
86	KAMeMS	MeLy				Ø
87	NKS		Ø		Ø	Ø
	KAMaMS		1:32		1:32	Ø
	KAMaEryS		1:128		1:16	Ø
105	KAMeMS	MeE		1:8000	1:32	1:32
	KAMeMS	MeE+L		1:8000	Ø	Ø
	KAMeMS	MeE+3xM		Ø	Ø	Ø
	KAMeLS	MeE		1:2000	1:1000	1:2000
	KAMeLS	MeE+L		Ø	Ø	Ø
	KAMeLS	MeE+2xM		Ø	1:500	1:1000
139	KAMeMS	MeE	1:2		1:625	
	KARMS				1:64	1:8
	KARMS	RE				1:1
	KARTS				1:16	1:256
	KARTS	RE			1:1	
162	KAMaMS	s.c.			1:80	
	KAMaMS	i.v.			1:20	
40	NKS	MaE bei Serumverdünnung	1:20	M 23		L 25
	KAMaMS	MaE % tote		81		32
	KAMaLS	MaE		31		88
101	KAMeMS	MeE Wirkung erhalten	2 %	10 %	Serum	
	KAMaMS	MaE+2xL bei	2 %	10 %		
132	KAMaMS	Serumverdünnung	tot nach 1 Min	72 %	Ø	
		1:5	30 Min	99 %	14 %	

* Nummer des Literaturverzeichnisses

Tab. 10: Agglutinierende und zytotoxische Antikörpertiter gegen Erythrozyten, Makrophagen und Lymphozyten verschiedener hergestellter Antimakrophagenseren im Vergleich zu Antilymphozytenseren und Normalseren.

Verwendete Abkürzungen:

KAMaES = Kaninchen-anti-Maus-Erythrozyten-Serum
KAMaLS = Kaninchen-anti-Maus-Lymphozyten-Serum
KAMaMS = Kaninchen-anti-Maus-Makrophagen-Serum
KAMeLS = Kaninchen-anti-Meerschweinchen-Lymphozyten-Serum
KAMeMS = Kaninchen-anti-Meerschweinchen-Makrophagen-Serum
KARMS = Kaninchen-anti-Ratten-Makrophagen-Serum
KARTS = Kaninchen-anti-Ratten-Thymozyten-Serum
NKS = Normal-Kaninchen-Serum
PARMS = Pferde-anti-Ratten-Makrophagen-Serum
PARTS = Pferde-anti-Ratten-Thymozyten-Serum

Absorption mit: E = Erythrozyten, L = Lymphozyten,
Le = Leberzellen, M = Makrophagen, Sc = Schaf.

sieht man von der intravenösen Verabreichung alveolärer Makrophagen bei HEISE und WEISER (79) ab.

Die eigenen AMS zeichnen sich gemessen an den zur Immunisierung verwendeten Zellzahlen bei weitgehendem Fehlen antilymphozytärer Antikörper durch enttäuschend niedrige Antimakrophagenantikörpertiter aus.

b) Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen wird die Wirksamkeit von AMS auf Makrophagen teils in vitro (81), teils in vivo (122) im ultrastrukturellen Bereich nachgewiesen. Ergebnisse von HIRSCH et al. (81) zeigen eine eindeutige Schädigung der Mehrzahl von Makrophagen 2 Stunden nach Inkubation mit AMS im Vergleich zu Kontrollen. Die Schädigung ist nach 24 Stunden komplett und geschieht auch nach größerer Verdünnung (1 : 50) des AMS. Lymphozyten, die durch ALS eindeutig geschädigt werden (97), werden durch AMS nicht beeinträchtigt. Auch in vivo läßt sich die spezifische Serumwirkung nachweisen, wobei nach subkutaner Injektion drainierende Lymphknoten untersucht werden (122). Mit Erythrozyten und Thymozyten absorbierbares AMS entfaltet eine eindeutige und gute Wirkung nur gegen

Makrophagen und umgekehrt mit Erythrozyten und Makrophagen absorbiertes Antithymozytenserum eine Wirkung gegen Lymphozyten des Lymphknotens.

c) Die zytotoxische Wirksamkeit hergestellter Antimakrophagenseren in vivo wird vor allem durch intraperitoneale Injektion des Serums und anschließende Untersuchung des Peritonealzellexudates nachgewiesen. Bereits kurz nach Seruminjektion zeigen sich Verklumpung und Zelluntergang von Makrophagen (162), nach längerem Intervall (6-48 Stunden) auch bei zunächst noch überlebenden Zellen Plasmaödem (101, 162) und Kernveränderungen (162). Die Gesamtzellzahl ist im Vergleich zu mit Normalserum oder Salzlösung behandelten Tieren erheblich vermindert bei starker Abnahme des Makrophagenanteils (35), wobei die Zahl der Lymphozyten (35) und Granulozyten (35, 101) sogar leicht erhöht sein kann, und etliche der gewonnenen Makrophagen sind bereits abgetötet. Weiterhin läßt sich in vivo die zytotoxische Wirkung an drainierenden Lymphknotenuntersuchungen nach subkutaner AMS Gabe zeigen (122, 156).

Die untersuchten Auswirkungen einer AMS Behandlung auf das weiße Blutbild dienen dagegen mehr dem Nachweis der Spezifität der hergestellten Seren. Die gleichzeitige Untersuchung einer möglichen zytotoxischen Wirksamkeit gegen Monozyten führten wir durch, wobei sich allerdings im Vergleich zu Normalserum nur ein sehr geringer Effekt zeigte, der noch dazu trotz längerer Behandlung nur die ersten zwei Tage anhielt. Die geringe und vorübergehende Lymphopenie nach Gabe von AMS im Vergleich zur Wirkung eines unabsorbierten Normalserums, die wir ebenso wie HEISE und WEISER (79) fanden, obwohl auch sie serologisch keine antilymphozytären Antikörper nachweisen konnten, mag auf eine geringe Höhe antilymphozytärer Aktivität hindeuten. Für die unter Serumbehandlung eingetretene Granulozytopenie finden wir uns in Übereinstimmung mit LOEWI et al. (101), während HIRSCH et al. (81) keinerlei Unterschiede zwischen einer mit AMS und einer mit Normalserum behandelten Gruppe findet. Dagegen kommt es bei DYMINSKI und ARGYRIS (40) bei Behandlung mit einem Antiperitonealzellserum zu einem sehr starken generellen Zellab-

fall, der den unter ALS Behandlung beobachteten sogar übertrifft, mit einem starken Abfall vornehmlich der Lymphozyten, wie er typischerweise nach ALS Behandlung eintritt (79, 94, 144), was für das Vorliegen einer ausgeprägten antilymphozytären Potenz spricht.

d) Die Wirksamkeit hergestellter Antimakrophagenseren läßt sich weiterhin an der Beeinflußbarkeit Makrophagen eigener Eigenschaften testen. Die Fähigkeit der Makrophagen, sich unter bestimmten Kulturbedingungen an Glas anzuheften, bietet ein solches Modell. Nach Vorbehandlung mit AMS verlieren Makrophagen diese teilweise (162) oder vollständig (81, 86). Dabei geben JEHN et al. (86) unter Verwendung einer Serumverdünnungsreihe den Titer von 1:1280 an, bis zu dem sich das Anheften der Makrophagen an Glas verhindern läßt. Zusätzlich lassen sich Makrophagen, die bereits in einer Kultur an Glas angeheftet sind, durch AMS Zugabe so schädigen, daß sie spätestens 24 Stunden später vollständig abgelöst sind (81)

Die Einschränkung der Phagozytoseaktivität der Makrophagen durch AMS ist ein gutes Maß für die Wirksamkeit der Seren. Die Mehrzahl der Untersucher testet wie wir in vitro (81, 87, 105, 162), es werden aber auch Phagozytostests in vivo durchgeführt (7, 35). Zur Phagozytose gelangen entweder heterologe Erythrozyten (7, 35, 87, 105, 162) oder Partikel (81, 162). Verglichen mit für Schafer erythrozyten gefundenen Normalwerten (2) gelingt einigen Untersuchern durch ihr AMS eine sehr starke (7, 81, 87), anderen wie uns eine gute (105, 162) und wieder anderen eine weniger ausgeprägte (35) Hemmung der Phagozytoseaktivität.

Im "Carbone clearance" Test (19), der einen in vivo Phagozytose-test darstellt, findet sich nach AMS Behandlung eine erhebliche Verlangsamung der Kohleteilchenelimination aus dem Blut (81, 101), die nach Behandlung mit Normalserum gegenüber unbehandelten Kontrollen sogar beschleunigt sein kann (81). ALS wird eine solch verlangsamende Wirkung ebenfalls zugeschrieben (101, 151), was durch möglicherweise vorhandene Antimakro-

phagenantikörper bedingt sein kann.

e) Untersuchungen über eine mögliche Beeinflußbarkeit der Antikörperbildung durch AMS werden durchgeführt. Dabei wird teils eine wirksame Hemmung der Antikörperbildung in vitro (86, 152) und in vivo (132, 139) gefunden, allerdings werden von diesen Untersuchern keine näheren Angaben zur Spezifität ihrer hergestellten Seren angegeben. Da es sich teilweise um Antiperitonealzellseren (132) handelt, muß eine starke anti-lymphozytäre Komponente in den gebrauchten Seren angenommen werden. Bei Behandlung mit AMS, dessen spezifische, nur gegen Makrophagen gerichtete Wirksamkeit nachgewiesen war (35, 79, 101), findet sich dagegen im Vergleich zur Behandlung mit Normalserum entweder keine Verminderung der Antikörperbildung gegen Diphtherietoxoid (35) oder bei Testung mit PPD nur eine sehr schwache Wirkung (79, 101), die der durch ALS hervorgerufenen wesentlich nachsteht.

f) Antimakrophagenseren werden zur Herabsetzung der Abwehrkräfte gegen bakterielle und virale Infektionen verwendet. Die Streptokokkenarthritis (28), die normalerweise bei Versuchstieren nicht auftritt, läßt sich nach Schädigung der Makrophagen durch AMS auch hier zeigen und erforschen. Die Nützlichkeit intakter Makrophagen wird an einem Virusinfekt dokumentiert (81), an dem mit AMS behandelte Tiere sterben, während unbehandelte überleben.

Aus der Darstellung der Eigenschaften hergestellter Antimakrophagenseren, die in Tabelle 11 stichpunktartig zusammengestellt sind, ist ersichtlich, daß es bisher noch nicht gelang, ein ideales Antimakrophagenserum herzustellen, das nämlich eine hohe Potenz nur gegen Makrophagen beinhalten sollte. Es lassen sich aber einige wesentliche Schlüsse ableiten: (a) Zur Immunisierung sollten nur reine Makrophagensuspensionen verwendet werden. Mit einem Zellengemisch, wie es im Peritonealzelllexudat vorliegt, können niemals reine Antimakrophagenantikörper gewonnen werden. (b) Für die Potenz eines hergestellten Serums scheint neben der Höhe der verabreichten Zellzahl der Immunisierungsweg von großer Bedeutung zu sein und hier läßt sich

Tab. 11: Stichpunktartige Zusammenfassung festgestellter Eigenschaften verschiedener hergestellter Antimakrophagenseren.

Untersucher *	Vorbereitung des Immunisierungsmaterials	verabreichte Zellzahl bis 10 ⁸ +, über 10 ⁹ +++	Serologische Wirkung	dto. Spezifität	Elektronenmikroskopische Wirkung	dto. Spezifität	Zytotoxische Wirksamkeit in vivo	dto. Spezifität	Glasanheften	Phagozytostest	Immunsuppressive Wirkung
7	Ø	+++								++	
28	Ø	++									
35	Ø	+	++	+			+	+		(+)	-
40	Ø	+++	(+)	-				-			
72	Ø	+++	+	-							
79	alv.	++	++	+				+			(+)
81	+	+			+			+	+	++	
86	+	+							+		+
89	+	++	(+)	+						++	
95,96 98	+	+++	+	+	+	+	(+)	+		+	++
101	+	+					+	+		+	(+)
105	+	++	++	(+)						+	
132	Ø	++									+
139	+	+	++								+
(122)											
154 (156)	Ø		+	(+)	+	(+)	+	(+)			
162	+	+	+				+		(+)	+	

* Nummer des Literaturverzeichnisses

möglicherweise durch intramuskuläre Eingabe eine Verstärkung der Wirksamkeit erreichen. (c) Makrophagen besitzen ein eigenes Antigenmuster. In einem Serum möglicherweise vorhandene, störende Antikörper lassen sich ohne Beeinflussung der Antimakrophagenaktivität absorbieren. (d) Spezifische Antimakrophagenseren besitzen eine gute Wirksamkeit gegen Makrophagen in vivo und in vitro, wie an Zelluntersuchungen, im Phagozytostest und beim Glasanheften nachgewiesen ist, ihre Nützlichkeit bei Immunsuppression muß dagegen eher mit Vorsicht beurteilt werden, zumindest bei Antigenen wie Diphtherietoxoid und Tuberkulin.

Im Vergleich mit anderen stellt sich unser AMS als ein weniger potentes aber sehr spezifisches, nur gegen Makrophagen gerichtetes Antiserum dar. Es zeigt sich hier, daß sich der von uns gewählte Weg der Makrophagenanreicherung aus dem Peritonealreizexudat mittels Inkubation mit ALS als einfach und gut erwies. Allerdings scheinen sich die bei der Immunisierung notwendigerweise gleichzeitig mit dem Immunisierungsmaterial verabreichten passiven, gegen Lymphozyten gerichteten Antikörper auf die erreichte Potenz negativ ausgewirkt zu haben.

IV. Immunsuppressive Wirkung von AMS bei Hauttransplantaten und Antikörperbildung gegen Schaferythrozyten

a) Unser mit Rattenerythrozyten absorbiertes Kaninchen-anti-Ratten-Makrophagen-Serum bewirkt im Vergleich zu mit Rattenerythrozyten absorbiertem Normal-Kaninchen-Serum eine mäßige Verlängerung der Überlebenszeit allogener DB-VI Transplantate und eine stärkere Verlängerung der Überlebenszeit xenogener Kaninchenohrhauttransplantate bei Sprague-Dawley Ratten. Meerschweinchenrückenhauttransplantate konnten dagegen durch AMS in ihrer Überlebenszeit nicht beeinflußt werden.

Bei allogener Transplantation war durch AMS Behandlung stets eine geringere Wirkung auf die Überlebenszeit als durch Behandlung mit ALS zu erreichen, ein Befund, der von DYMINSKI und ARGYRIS (40) ebenfalls erhoben wurde. Möglicherweise ist das

nur Ausdruck einer mangelnden Potenz des verwendeten AMS, obwohl beide Seren an verschiedenen Stellen angreifen und auch dies die Ursache für eine unterschiedliche Wirksamkeit bei der Transplantatverlängerung begründen kann. Bei Untersuchung der das Transplantationsgebiet drainierenden Lymphknoten finden sich Makrophagen von Lymphozyten umlagert (150). Es kommt danach zur Ausbildung großer, pyroninophiler Zellen, die die zur Transplantatabstoßung notwendigen Immunozyten bilden (68). Den wirkungsvollen Angriff von AMS muß man sich entsprechend in einer sehr frühen Phase, bis zur stattgefundenen Übermittlung der Information vom Transplantat zum Lymphozyten oder in der Schlußphase, im behinderten Abräumen des durch Immunozyten geschädigten Transplantats vorstellen. ALS kann demgegenüber seine Wirkung im gesamten Behandlungszeitraum positiv entfalten. Entsprechend kommt bei Verwendung von AMS dem Behandlungsschema eine größere Bedeutung zu. Folgt man den Befunden von PEARSALL und WEISER (134), so müßte zu einer positiven Beeinflussung im afferenten Schenkel vorbehandelt und entsprechend zur Behinderung im efferenten Schenkel ab dem fünften Tag nach durchgeführter Transplantation behandelt werden. Wir fanden nach täglicher Behandlung von -7 bis +2 und an den Tagen +1, +3, +5 mit AMS die gleiche Verlängerung der Überlebenszeit allogener Transplantate. Da es durchaus unwahrscheinlich ist, daß von der am Tag +5 verabreichten Antiserumgabe noch ein Effekt im efferenten Schenkel erwartet werden kann, scheint eine Seruminjektion am Tag +1 noch ausreichend, um eine Informationsübermittlung durch Makrophagen zu Lymphozyten wirksam zu verzögern. Dies ist unter der Vorstellung, daß es sich bei Gabe eines Zellgiftes (134) um einen protrahierten Wirkungseintritt handelt, durchaus erklärlich. Eine Verlängerung allogener Hauttransplantate durch ein Antipерitonealzellserum finden DYMINSKI und ARGYRIS (40) bei Behandlung an den Tagen -1, +2, +5 oder -2, +1, +3, +5, +7, +9 und GRONEMEYER et al. (72) bei Behandlung an den Tagen +1 und +4. Allerdings handelt es sich in beiden Fällen um kein spezifisches AMS wie bereits nachgewiesen wurde (Tabelle 11) und auch hier

durch den Wirkungsabfall nach unspezifischen Absorptionen mit Erythrozyten, Leber- oder Nierengewebe (72) bestätigt wird. Vielmehr handelt es sich um Seren, die Antikörper gegen mehrere Zellarten enthalten, was zum Erreichen einer Transplantatverlängerung aber durchaus nützlich sein kann, wie SONNTAG und MÜLLER-RUCHHOLTZ (154) zeigten, die durch kombinierte Behandlung mit spezifischen AMS und ALS eine bessere immunsuppressive Wirkung bei Hauttransplantaten erreichten als durch Gabe der einzelnen Seren, die allerdings beide auch immunsuppressiv wirksam waren, was den zuvor angenommenen unterschiedlichen Angriffspunkt beider Seren im Organismus unterstreicht.

Bei der xenogenen Transplantation wurde AMS bisher noch nicht angewendet. Hier zeigte sich nun bei Übertragung von Kaninchenohrhaut auf den Rücken von Sprague-Dawley Ratten unter Behandlung an den Tagen +1, +3, +5 mit Kaninchen-anti-Ratten-Makrophagen-Serum eine ausgeprägtere Verlängerung der Überlebenszeit, als sie für allogene Transplantate zu finden war. Bemerkenswerter scheint noch, daß die Wirkung von AMS die unter ALS Behandlung erreichbare hier deutlich übertrifft (Abbildung 11). Obwohl serologisch keine Unterschiede nachweisbar sind, erweist sich die zweite hergestellte Charge (AMS_2) hier wirksamer als die dritte (AMS_3). Diese erweist sich allerdings als sehr spezifisch, da sie nach Absorption mit Lymphozyten (AMS_{3a}) keinen Verlust der immunsuppressiven Wirksamkeit erleidet, während ALS nach gleichartiger Absorption (ALS_a) praktisch unwirksam ist. Unklar bleibt, weshalb Kaninchenohrhaut in der Überlebenszeit verlängert werden konnte, während auf die Überlebenszeit von Meerschweinchenrückenhaut durch AMS kein Einfluß genommen werden konnte. Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein technisches Versagen, wo es beim Durchstanzen der viel dickeren Meerschweinchenrückenhaut zu einer Druckschädigung gekommen sein könnte, vielleicht heilt sie wegen ihrer Dicke, wo sie nach Transplantation bei der Ratte über das Niveau der Rattenhaut herausragt, einfach schlechter ein und stellt sich das gewählte System deshalb als ungeeignet heraus. Bedacht werden muß jedoch ein möglicher Zusammenhang bei Trans-

plantation mit Kaninchenhaut unter Behandlung mit Kaninchen-serum, wo nämlich Antiserum und Transplantat von der gleichen Spezies stammen. Bekanntlich kommt es bei Serumbehandlung zur Antikörperbildung gegen Serumproteine (35), weshalb neuerdings bei notwendiger, längerdauernder Serumbehandlung zunächst eine Toleranzinduktion für die Serumproteine vorgenommen wird (99). Es wäre denkbar, daß die gebildeten Antikörper zunächst von den mobileren Serumproteinen abgefangen werden, allerdings müßte man dann für ALS und NKS eine gleiche Wirkung erwarten, was nicht zutrifft. Es könnte sich jedoch auch um einen kombinierten Vorgang handeln, wo das AMS zunächst im afferenten Schenkel seine Wirkung durch Verzögerung der Informationsübermittlung zwischen Transplantat und Lymphozyten entfaltet und anschließend ein antigener Wettbewerb stattfindet. Jedenfalls scheint den Wirtsmakrophagen im Abstoßungsprozeß xenogener Transplantate bei Ratten eine besonders entscheidende Rolle zuzukommen.

Auffallend ist ein geringer immunsuppressiver Effekt von Normal-Kaninchen-Serum bei der allogenen und xenogenen Transplantation. Möglicherweise handelt es sich um beschriebene natürliche, gegen Rattenlymphozyten gerichtete Antikörper (12,32) mit geringer immunsuppressiver Aktivität, obgleich wir solche präexistierenden Antikörper in vitro nicht nachweisen konnten. Da nach Absorption des Normalkaninchen-serums mit Rattenerythrozyten dieser immunsuppressive Effekt nicht mehr nachweisbar ist, scheinen die natürlichen, gegen Spezieslymphozyten gerichteten Antikörper mit Erythrozyten der Spezies absorbierbar zu sein und erweist sich ein so absorbiertes NKS als ein geeignetes Kontrollserum für AMS, das ja ebenfalls mit Rattenerythrozyten absorbiert wurde.

b) Unser AMS zeigte auch eine, wenn auch sehr geringe immunsuppressive Wirkung bei der Bildung humoraler Antikörper gegen Schafererythrozyten bei Sprague-Dawley Ratten. Im Gegensatz zu uns fanden DESPONT und CRUCHAUD (35) und LOEWI et al (101) im Vergleich zu Normalserum, eine Kontrolle, die wir hier nicht

durchführten, hier keine Immunsuppression. Allerdings verwendeten DESPONT und CRUCHAUD (35) ein unabsorbiertes Normalserum, das, wie oben erwähnt, natürliche präexistierende Antikörper mit einer allerdings geringen antilymphozytären Potenz enthält und als Kontrollserum weniger geeignet ist, weshalb eine gewisse immunsuppressive Wirkung auch deren AMS bei der Antikörperbildung gegen Schafererythrozyten nicht letztlich ausschließbar ist. Daß sich in diesem System mit ALS eine erheblich bessere Immunsuppression erreichen läßt, ist dagegen unbestritten (101).

Da es durchaus umstritten ist, ob Makrophagen, deren Notwendigkeit bei der Bildung humoraler Antikörper gegen verschiedene Eiweiße, Bakterien, Viren und Bakteriophagen schlüssig nachgewiesen ist, bei der humoralen Antikörperbildung gegen heterologe Erythrozyten erforderlich sind, erweisen sich Schafererythrozyten zur Prüfung, ob Antimakrophagenseren auch bei der Bildung humoraler Antikörper einen immunsuppressiven Effekt zeigen oder eventuell sogar zur Toleranzinduktion geeignet sind, als unglücklich gewähltes Antigen. Während einige Untersucher auch bei der Antikörperbildung gegen heterologe Erythrozyten die Notwendigkeit funktionstüchtiger Makrophagen nachweisen (40, 46, 53, 117, 152) und es ohne Makrophagenfunktion zur Toleranzinduktion kommen soll (117), zeigen andere auf, daß lediglich Lymphozyten erforderlich sind. Es soll sich demnach um zwei unterschiedliche Lymphozyten handeln, die einen sind Thymus-abhängig und stellen die Antigen-reaktiven Zellen dar, während die anderen Knochenmark-abhängig sind und die Vorstufen der antikörperbildenden Zellen beinhalten (63, 106, 113). Beide Lymphozytenarten sind in Ductus thoracicus Lymphe (111, 114, 130) und in der Milz (112) in ausreichender Menge vorhanden und können die Reaktionsbereitschaft zur Antikörperbildung in letal bestrahlten Versuchstieren voll wiederherstellen. Auf eine mögliche Mitbeteiligung der Makrophagen, die mit Sicherheit in der Milz, wahrscheinlich auch in der Ductus thoracicus Lymphe (146) enthalten sind, wird nicht eingegangen, sie kann deshalb nicht letztlich bestritten werden.

Aus der bei uns gefundenen leichten Immunsuppression durch AMS bei der Antikörperbildung gegen Schafererythrozyten kann wohl allerdings nicht auf eine unbedingte Mitwirkung der Makrophagen bei dieser Immunantwort geschlossen werden, wenn sie auch weiterhin wahrscheinlich bleibt.

Zu erwähnen bleibt hier, daß in Untersuchungen von FELDMANN et al. (45) aus der Arbeitsgruppe von NOSSAL, die nach Abschluß unserer Studie durchgeführt wurden, ebenfalls eine Unterdrückung der Immunantwort gegen Schafererythrozyten bei der Maus durch AMS nachgewiesen werden konnte.

V. Toleranzinduktion durch AMS

Unter der Vorstellung, daß sich durch vollständige Ausschaltung der Makrophagenfunktion in der Frühphase der Immunantwort eine Toleranz im Sinne der "direct access theory" von MITCHISON (117) erzeugen ließe, wie sie für Schafererythrozyten angegeben ist, indem nämlich das Antigen unter Umgehung der Makrophagen direkt an die immunkompetenten Lymphozyten gelangen würde, was zu einer Nicht-Beantwortung des Reizes führen sollte, wurde kurz vor, während und kurz nach (-4 bis +2) einer Antigengabe mit Antimakrophagenserum behandelt. Als Antigen dienten einmal Schafererythrozyten und bei der versuchten Toleranzerzeugung für Hauttransplantate Milzzellen, die sich als geeignet erwiesen hatten (1,25,69). Es muß festgestellt werden, daß es uns nicht gelang für Schafererythrozyten eine Toleranz zu erzeugen. Ebenso wenig ist ein Toleranzstadium in der xenogenen Gruppe, wo Kaninchenmilzzellen vorgegeben waren und nach 14 Tagen die Ohrhaut des gleichen Spendertieres transplantiert wurde, anzunehmen, da die Überlebenszeit der übertragenen Haut nicht mehr verlängert war als in irgendeinem anderen durchgeführten xenogenen Versuch und auch nur unwesentlich über der mit ALS behandelten Kontrollgruppe liegt.

Interessanter sind die Ergebnisse der allogenen Gruppen, wo sich einmal bei Vorgabe einer großen Anzahl von Milzzellen (4×10^8) durch AMS überhaupt keine Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit verglichen mit unbehandelten Kontrollen ergab, während es in der mit einer niedrigeren Anzahl von Milzzellen (4×10^6) immunisierten Gruppen zu einer deutlichen Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit kam (Abbildung 12). Da es sich bei durchgeführten allogenen Versuchen hier einmal um die größte bei uns erreichte Transplantatverlängerung handelt und sich zum anderen nur hier AMS einer mit ALS behandelten Vergleichsgruppe überlegen zeigt, muß es sich um das Vorliegen einer partiellen Immuntoleranz gehandelt haben.

Weshalb es in den anderen Versuchen nicht gelang eine Toleranz zu erzeugen, liegt möglicherweise vor allem an der mangelnden Wirkung des zu wenig potenten Serums, womit sich zum Zeitpunkt der Antigengabe nur eine ungenügende Schädigung einer zu kleinen Anzahl von Makrophagen erreichen ließ. Vielleicht könnte auch durch ein verändertes Behandlungsschema, in dem größere Serummengen in einem kürzeren Intervall verabreicht würden, eine bessere Wirkung erzielt werden.

AUSBLICK

Die an Hand der gefundenen Ergebnisse bestehende immunsuppressive Wirksamkeit des hergestellten Antimakrophagenserums besonders bei genetisch entfernten Spezies, also im xenogenen Bereich ist Anreiz genug, sich auch weiterhin mit der Herstellung von AMS zu beschäftigen. Dabei sollte die Forderung, ein potentes Serum bei hoher Spezifität herzustellen, immer im Vordergrund stehen. Zum Nachweis der Spezifität sollten möglicherweise noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, während die Wirksamkeit gegen Makrophagen nicht nur bei in vitro - Versuchen sondern auch in vivo nachgewiesen sein sollte.

Folgt man der Vorstellung, daß Makrophagen in der Frühphase der Immunantwort im Vorbereiten und Aufbereiten des Antigens eine Aufgabe zukommt, so muß das Ziel einer Behandlung mit

Antimakrophagenserum sein, zum Zeitpunkt der Antigengabe und einige Zeit darauf die Makrophagen auszuschalten. Ein weiterer sinnvoller Behandlungszeitraum wäre kurz vor Beginn der zu erwartenden Abstoßungsphase denkbar, um die Makrophagenfunktion im efferenten Schenkel (102) wirkungsvoll zu unterdrücken. Da die Gewebsmakrophagen sich im Wesentlichen aus den Monozyten des Blutes rekrutieren, die wiederum Tochterzellen der Promonozyten des Knochenmarks sind, und der antigene Kontakt häufig im Blut mit Monozyten stattfindet, müßte die Serumwirkung entweder bereits im Knochenmark, zumindest aber bei den Blutmonozyten nachweisbar sein. Ein Serum, das keine oder keine ausreichende Wirkung auf Blutmonozyten hat, entspricht nicht den Zielvorstellungen. Sollte es nicht gelingen, nach Immunisierung mit Peritonealmakrophagen, die den Blutmonozyten noch relativ verwandt zu sein scheinen (13, 26, 59), auch eine ausreichende Wirkung gegen Blutmonozyten zu erzielen, sollten Seren nur noch mit eben diesen Zellen hergestellt werden. Möglichkeiten der Monozytentrennung aus peripherem Blut sind angegeben, wobei unter obiger Zielvorstellung die Methode von RABINOWITZ (141) den kulturellen Methoden (16, 29, 52, 80) vorzuziehen wäre, da sich während der Kulturdauer Veränderungen an den Monozyten vollziehen (16), wie sie für Makrophagen typisch sind, Änderungen, die sowohl die Morphologie als auch enzymatische Funktionen der Zellen betreffen (31). Auch scheint eine Immunisierung mit Alveolarmakrophagen, wie sie bei HEISE und WEISER (29) angegeben ist, nicht sinnvoll, da diesen keine Mitbeteiligung im immunologischen Prozeß zugeschrieben wird (30).

Entsprechend der gewünschten, relativ kurzfristigen Ausschaltung der Makrophagen, was im Hinblick auf die Funktion dieser Zellen bei der Infektabwehr (28,81) besonders wichtig ist, müßten während der Behandlungsphase sicher in kurzen Zeitabständen hohe Serumdosen verabreicht werden. Unter einer solchen Behandlung sollte die erreichbare Immunsuppression auch an weiteren Testmodellen geprüft werden, wobei sich dann auch Aussagen über eine mögliche Toleranzinduktion machen ließen.

Außerdem ist zur weiteren Abklärung der Wirkung von AMS die Prüfung an anderen Speziessystemen wünschenswert, um festzustellen, in wie weit sich neue Möglichkeiten zur Transplantation xenogener Gewebe auch für den Menschen ergeben könnten.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Es wurde ein xenogenes Antirattenmakrophagenserum vom Kaninchen hergestellt, wobei zur Erreichung einer hohen Spezifität des Serums ein neuer Weg der Lymphozytenabtrennung aus dem Peritonealreizexudat beschritten wurde. Die gesammelten Peritonealzellen wurden zunächst mit einem hochtitrigen Antirattenlymphozytenserum inkubiert und die vorhandenen Lymphozyten dadurch abgetötet. Um eine Antikörperbildung gegen restliche, nach mehrmaligem Waschen im Immunisierungsmaterial noch vorhandene Lymphozytentrümmer zu verhindern, wurde den zur Immunisierung verwendeten Kaninchen gleichzeitig mit jeder Antigengabe noch Antirattenlymphozytenserum injiziert.

Nach dieser Methode wurde ein spezifisches, jedoch nicht sehr potentes Anti-Rattenmakrophagenserum vom Kaninchen hergestellt. Die Spezifität konnte sowohl an Hand serologischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen als auch in vivo an Blutbilduntersuchungen nachgewiesen werden. Die Wirksamkeit zeigte sich zusätzlich in vitro im Phageozytostest und in vivo in einer verminderten sekundären Immunreaktion gegen Schaferythrozyten und in einer Verlängerung allogener (Spendertier: DB VI - Ratten) und xenogener (Spendertier: Kaninchen) Hauttransplantate bei Sprague-Dawley Ratten. Bemerkenswert war, daß dieses wenig potente AMS die Überlebenszeit xenogener Hauttransplantate stärker verlängern konnte als ALS, während sich für allogene Hauttransplantate eine umgekehrte Wirkung ergab.

E. L I T E R A T U R

- 1) Argyris, B.F.
Adoptive tolerance; transfer of the tolerant state.
J. Immunol. 90, 29 - 34 (1963)
- 2) Argyris, B.F.
Role of macrophages in antibody production.
J. Immunol. 99, 744-750 (1967)
- 3) Argyris, B.F.
Role of macrophages in immunological maturation.
J. exp. Med. 128, 459-467 (1968)
- 4) Argyris, B.F.
Effect of passive antiserum on antigen phagocytosis and degradation by mouse peritoneal macrophages.
J. Reticuloendothel. Soc. 6, 498-510 (1969)
- 5) Argyris, B.F.
Transplantation of adult peritoneal cells into newborn mice.
Transplantation 8, 241-248 (1969)
- 6) Argyris, B.F. and B.A. Askonas
Mouse peritoneal cells: Their ability to elicit or produce antibody after exposure to antigen.
Immunology 14, 379-392 (1968)
- 7) Argyris, B.F. and D.H. Plotkin
Effect of antimacrophage serum on antibody production and phagocytosis in mice.
J. Immunol. 103, 372-373 (1969)
- 8) Aronow, R., D. Danon, A. Shahar and M. Aronson
Electron microscopy of in vitro endocytosis of T₂ Phage by cells from rabbit peritoneal exudate.
J. exp. Med. 120, 943 - 954 (1964)
- 9) Aronson, M.
Bridge formation and cytoplasmic flow between phagocytic cells.
J. exp. Med. 118, 1083 - 1088 (1963)
- 10) Askonas, B.A. and J.M. Rhodes
Immunogenicity of antigen-containing ribonucleic acid preparations from macrophages.
Nature 205, 470-474 (1965)
- 11) Azar, M.M.
Studies on immunological tolerance to soluble proteins.
I. Organ distribution of antigen in the adult mouse.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125, 849-852 (1967)

- 12) Barth, R.F., R.L. Hunter, J. Southworth and A.S. Rabson
Studies on heterologous antilymphocyte and antithymocyte sera. III. Differential effects of rabbit anti-mouse sera on splenic lymphocytes and macrophages.
J. Immunol. 102, 932-940 (1969)
- 13) Bennett, B.
Isolation and cultivation in vitro of macrophages from various sources in the mouse.
Amer. J. Path. 48, 165-181 (1966)
- 14) Bennett, B. and B.R. Bloom
Reactions in vivo and in vitro produced by a soluble substance associated with delayed-type hypersensitivity.
Proc. Nat. Acad. Sci. 59, 756-762 (1968)
- 15) Bennett, B. and P. Licursi
Action of isoimmune serum on peritoneal cells in vitro.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 116, 404 - 409 (1964)
- 16) Bennett, W.E. and Z.A. Cohn
The isolation and selected properties of blood monocytes.
J. exp. Med. 123, 145-159 (1966)
- 17) Berken, A. and B. Benacerraf
Sedimentation properties of antibody cytophilic for macrophages.
J. Immunol. 100, 1219-1222 (1968)
- 18) Billingham, R.E. and P.B. Medawar
The technique of free skin grafting in mammals.
J. Exp. Biol. 28, 385-402 (1951)
- 19) Biozzi, G., B. Benacerraf and B.N. Halpern
Quantitative study of the granulopoietic activity of the reticulo-endothelial system. II: A study of the kinetics of the granulopoietic activity of the R.E.S. in relation to the dose of Carbone injected. Relationship between the weight of the organs and their activity.
Brit. J. Exp. Path. 34, 441-457 (1953)
- 20) Bishop, D.C., A.V. Pisciotta and P. Abramoff
Synthesis of normal and "immunogenic RNA" in peritoneal macrophage cells.
J. Immunol. 99, 751-759 (1967)
- 21) Boak, J.L. and N A. Mitchison
Stimulation of lymphocytes by direct exposure to antigen in vitro.
Transpl. Proc. 1, 539-542 (1969)
- 22) Boak, J.L., E. Kölsch and N.A. Mitchison
Immunological tolerance and inhibition by hapten.
Antibiotica Chemother. 15, 98-109 (1969)

- 23) Bollman, J.L., J.C. Cain and J.H. Grindlay
Techniques for collection of lymph from the liver, small intestine or thoracic duct of the rat.
J. Lab. clin. Med. 33, 1349 (1948)
- 24) Braun, W. and L.J. Lasky
Antibody formation in newborn mice initiated through adult macrophages.
Federation Proc. 26, 642 (1967)
- 25) Brent, L. and G. Gowland
Induction of tolerance of a skin homografts in immunologically competent mice.
Nature 196, 1298-1301 (1962)
- 26) Carr, I.
The fine structure of the cells of the mouse peritoneum.
Z. Zellforsch. 80, 534-555 (1967)
- 27) Catanzaro, P.J., R.C. Graham and H.J. Schwartz
Ultrastructural identification of possible sites of antigen processing in macrophages.
J. Immunol. 103, 618-621 (1969)
- 28) Cayeux, P., J. Panijel, R. Cluzan and R. Levillain
Streptococcal arthritis and cardiopathy experimentally induced in white mice.
Nature 212, 686-691 (1966)
- 29) Cline, M.J. and V.C. Swett
The interaction of human monocytes and lymphocytes.
J. exp. Med. 128, 1309-1324 (1968)
- 30) Cohn, Z.A.
The fate of bacteria within phagocytic cells.
III. Destruction of an escherichia coli agglutinin within polymorphonuclear leucocytes and macrophages.
J. exp. Med. 120, 869-883 (1964)
- 31) Cohn, Z.A. and B. Benson
The differentiation of mononuclear phagocytes. Morphology, cytochemistry, and biochemistry.
J. exp. Med. 121, 153-169 (1965)
- 32) Colley, D.G. and B.H. Waksman
Cytotoxic effect of normal rabbit serum on rat lymphoid cells.
Transplantation 9, 395-404 (1970)
- 33) Coulson, A.S., B.W. Gurner and R.R.A. Coombs
Macrophage-like properties of some guinea-pig transformed cells.
Int. Arch. Allergy 32, 264-277 (1967)

- 34) Cruchaud, A., J.P. Despont, J.P. Girard and B. Mach
Immunogenicity of human γ Globulin bound to macrophages
after inhibition of RNA synthesis.
J. Immunol. 104, 1256-1261 (1970)
- 35) Despont, J.P. and A. Cruchaud
In vivo and in vitro effects of anti-macrophage serum.
Nature 223, 838-839 (1969)
- 36) Dietrich, F.M. and W.C. Weigle
Immunologic unresponsiveness to heterologous serum proteins
induced in adult mice and transfer of the unresponsive
state.
J. Immunol. 92, 167-172 (1964)
- 37) Druckrey, H., P. Danneberg, W. Dischler and D. Steinhoff
Reinzucht von 10 Rattenstämmen (DB-Stämme) und Analyse
des genetischen Pigmentierungs-Systems.
Arzneim. Forsch. 12, 911-919 (1962)
- 38) Dumonde, D.C.
The role of the macrophage in delayed hypersensitivity.
Brit. med. Bull. 23, 9-14 (1967)
- 39) Dumonde, D.C., W.T. Howson and R.A. Wolstencroft
The role of macrophages and lymphocytes in reactions of
delayed hypersensitivity.
In: Immunopathology, Intern. Symp. 5th.
Mechanism of inflammation induced by immune reactions.
Ed. by P.A. Miescher, New York, P. Grabar, Paris.
Schwabe and Co., Basel-Stuttgart (1967)
- 40) Dyminski, J.W. and B.F. Argyris
Prolongation of allograft survival with antimacrophage
serum.
Transplantation 8, 595-601 (1969)
- 41) Ebert, R.H. and H.W. Florey
The extravascular development of the monocyte observed in
vivo.
Brit. J. exp. Path. 20, 342-356 (1939)
- 42) Ellis, S.T., J.L. Gowans and J.C. Howard
The origin of antibody forming cells from lymphocytes.
Antibiotica Chemother. 15, 40-55 (1969)
- 43) Feldman, M.
Macrophages, lymphocytes and antibody formation.
Antibiotica Chemother. 15, 56-63 (1969)
- 44) Feldman, M. and R. Gallily
Cell interactions in the induction of antibody formation.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32, 415-421 (1967)

- 45) Feldmann, M. and G.J.V. Nossal
Tolerance, enhancement and the regulation of interactions
between T cells, B cells and macrophages.
Transplant. Rev. 13, 3-34 (1972)
- 46) Feldman, M. and J. Palmer
The requirement for macrophages in the secondary immune
response to antigens of small and large size in vitro.
Immunology 21, 685-699 (1971)
- 47) Finkelstein, M.S. and J.W. Uhr
Specific inhibition of antibody formation by passively
administered 19 S and 7 S antibody.
Science 146, 67-69 (1964)
- 48) Fishman, M.
Antibody formation in vitro
J. exp. Med. 114, 837-856 (1961)
- 49) Fishman, M. and F.L. Adler
Antibody formation initiated in vitro. II. Antibody
synthesis in X-irradiated recipients of diffusion
chambers containing nucleic acid derived from macrophages
incubated with antigen.
J. exp. Med. 117, 595-602 (1963)
- 50) Fishman, M. and F.L. Adler
The role of macrophage-RNA in the immune response.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32, 343-348 (1967)
- 51) Fishman, M., R.A. Hammerstrom and V.P. Bond
In vitro transfer of macrophage RNA to lymph node cells
Nature 198, 549-551 (1963)
- 52) Fitzgeorge, R.B., M. Solotorovsky and H. Smith
The behaviour of *Brucella abortus* within macrophages
separated from the blood of normal and immune cattle by
adherence to glass.
Brit. J. exp. Path. 48, 522-528 (1967)
- 53) Ford, W.L., J.L. Gowans, and P.J. McCullagh
The origin and function of lymphocytes.
In: *Ciba Foundation Symp.: The thymus; experimental and
clinical studies.* pp. 58-78 (Melbourne 1965).
Churchill, London (1966)
- 54) Franzl, R.E. and J.A. Morello
The effect of peritoneal phagocytes on antibody production.
J. Reticuloendothelial. Soc. 3, 351 (1966)
- 55) Frei, P.C., B. Benacerraf and G.J. Thorbecke
Phagocytosis of the antigen, a crucial step in the induc-
tion of the primaty response.
Proc Nat. Acad. Sci. 53, 20-22 (1965)

- 56) Friedman, H.P., A.B. Stavitsky and J.M. Solomon
Induction in vitro of antibodies to Phage T 2: Antigens
in the RNA extract employed.
Science 149, 1106-1107 (1965)
- 57) Furth, R.van and Z.A. Cohn
The origin and kinetics of mononuclear phagocytes.
J. exp. Med. 128, 415-435 (1968)
- 58) Furth, R.van and M.M.C. Diesselhoff - Den Dulk
The kinetics of promonocytes and monocytes in the bone
marrow.
J. exp. Med. 132, 813 - 828 (1970)
- 59) Furth, R.van, J.G. Hirsch and M.E. Fedorko
Morphology and peroxidase cytochemistry of mouse pro-
monocytes, monocytes, and macrophages.
J. exp. Med. 132, 794-812 (1970)
- 60) Gallily, R. and M. Feldman
The role of macrophages in the induction of antibody
in X-irradiated animals.
Immunology 12, 197-206 (1967)
- 61) Gallily, R. and J.S. Garvey
Primary stimulation of rats and mice with hemocyanin in
solution and adsorbed on bentonite.
J. Immunol. 101, 924-929 (1968)
- 62) Garvey, J.S. and D.H. Campbell
The retention of S³⁵-labelled bovine serum albumin in
normal and immunized rabbit liver tissue.
J. exp. Med. 105, 361-372 (1957)
- 63) Gershon, H. and M. Feldman
Studies on the immune reconstitution of sublethally
irradiated mice by peritoneal macrophages.
Immunology 15, 827-835 (1968)
- 64) Goodman, J.W.
On the origin of peritoneal fluid cells.
Blood 23, 18-26 (1964)
- 65) Gottlieb, A.A.
Antigens, RNAs, and macrophages.
J. Reticuloendothel. Soc. 5, 270-281 (1968)
- 66) Gottlieb, A.A.
Macrophage ribonucleoprotein: Nature of the antigenic
fragment.
Science 165, 592-594 (1969)
- 67) Gottlieb, A.A., V.R. Glisin and P. Doty
Studies on macrophage RNA involved in antibody production.
Proc. Nat. Acad. Sci. 57, 1849-1856 (1967)

- 68) Gowans, J.L.
The role of lymphocytes in the destruction of homografts.
Brit. med. Bull. 21, 106-110 (1965)
- 69) Gowans, J.L., D.D. McGregor, D.M. Cowen and C.E. Ford.
Initiation of immune responses by small lymphocytes.
Nature 196, 651-655 (1962)
- 70) Granger, G.A. and R.S. Weiser
Homograft target cells: Contact destruction in vitro by
immune macrophages.
Science 151, 97-99 (1966)
- 71) Green, I.
Distribution of antibody-forming cells of different
specificities in the lymph nodes and spleens of guinea
pigs.
J. exp. Med. 128, 729-749 (1968)
- 72) Gronemeyer, U., H.-G. Sonntag und W. Müller-Ruchholtz
Serologische Spezifität und immunsuppressive Wirkung nicht-
absorbierter und absorbierter Pferde-anti-Rattenserum.
Z. Immunitätsf. Allerg. klin. Immunol. 140, 203-209 (1970)
- 73) Halpern, B.N.
The role and function of the reticulo-endothelial system
in immunological processes.
J. Pharm. and Pharmacol. 11, 321-338 (1962)
- 74) Hanifin, J.M. and M.J. Cline
Human monocytes and macrophages. Interaction with antigen
and lymphocytes.
J. cell. Biol. 46, 97-105 (1970)
- 75) Harris, G.
Studies of the mechanism of antigen stimulation of DNA
synthesis in rabbit spleen culutres.
Immunology 9, 529-541 (1965)
- 76) Harris, G.
Macrophages from tolerant rabbits as mediators of a speci-
fic immunological response in vitro.
Immunology 12, 159-163 (1967)
- 77) Harris, G. and R.J. Littleton
The effects of antigens and of phytohemagglutinin on
rabbit spleen cell suspensions.
J. exp. Med. 124, 621-634 (1966)
- 78) Harris, T.N. and W.E. Ehrlich
The fate of injected particulate antigens in relation to
the formation of antibodies.
J. exp. Med. 84, 157-165 (1946)

- 79) Heise, E.R. and R.S. Weiser
Tuberculin sensitivity: The effect of antilymphocyte and antimacrophage serum on cutaneous, systemic and in vitro reactions.
J. Immunol. 104, 704-709 (1970)
- 80) Hersh, E.M. and J.E. Harris
Macrophage-lymphocyte interaction in the antigen-induced blastogenic response of human peripheral blood leukocytes.
J. Immunol. 100, 1184 - 1194 (1968)
- 81) Hirsch, M.S., G.W. Gary and F.A. Murphy
In vitro and in vivo properties of antimacrophage sera.
J. Immunol. 102, 656-661 (1969)
- 82) Hoffmann, M.
Peritoneal macrophages in the immune response to SRBC in vitro.
Immunology 18, 791-797 (1970)
- 83) Humphrey, J.H.
The fate of antigen and its relationship to the immune response. The complexity of antigens.
Antibiotica Chemother. 15, 7-23 (1969)
- 84) Jacherts, D.
Informationsfluß bei der Antikörpersynthese.
Münch. Med. Wschr. 8, 328-330 (1970)
- 85) Jacherts, D. und H. Noltenius
Antikörper-Synthese in vitro. V. Die Informationsübertragung von der Antigen-verarbeitenden Zelle auf die antikörperproduzierende Zelle.
Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. 152, 112-133 (1966)
- 86) Jehn, U.W., D.M. Musher and L. Weinstein
The effect of antimacrophage serum on macrophage-lymphocyte interaction in vitro.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 134, 241-243 (1970)
- 87) Jennings, J.F. and L.A. Hughes
Inhibition of phagocytosis by anti-macrophage antibodies.
Nature 221, 79-80 (1969)
- 88) Jennings, J.F. and C.M. Oates
Studies on the nonspecific depression of the immune response.
J. exp. Med. 126, 557-564 (1967)
- 89) Kissmeyer-Nielsen, F. and R.E. Kjerbye
Lymphocytotoxic micro-technique purification of lymphocytes by flotation.
In: *Histocompatibility testing 1967*, pp. 381-383.
Eds.: E.S. Curtoni, P.L. Maltiuz, R.M. Tosil, Munksgaard (1968)

- 90) Kölsch, E.
Migration of macrophages carrying antigen into the thymus.
Experientia 24, 951-953 (1968)
- 91) Kölsch, E. and N.A. Mitchison
The subcellular distribution of antigen in macrophages.
J. exp. Med. 128, 1059-1079 (1968)
- 92) Land, W.
Wege der Immunsuppression.
Wiederbelebung und Organersatz 4, 49-61 (1967)
- 93) Land, W., W. Brendel, R. Pichlmayr; E. Wagner, G. Beck,
E. Schmitt diel und H. Stritzinger
Gewinnung eines Antihumanlymphocytenserums durch Immunisierung eines Pferdes mit leukämischen Lymphozyten unter gleichzeitiger Verabreichung eines Antihumanerythrocytenserums vom Pferd.
Klin. Wschr. 48, 757-759 (1970)
- 94) Land, W., E. Frick, R. Roscher, W. Brendel und A. Baethmann.
Wirkung eines heterologen Antilymphocytenserums auf die experimentelle allergische Encephalomyelitis.
Klin. Wschr. 47, 633-640 (1969)
- 95) Land, W. und G. Grabs
Herstellung und Wirkung eines xenogenen Antimakrophagen-serums bei der Ratte.
European J. Immunology 1, 37-38 (1969)
- 96) Land, W., G. Grabs and W. Brendel
Immunosuppressive effect of anti-macrophage antibodies in rats.
Europ. Surg. Res. 1, 211-212 (1969)
- 97) Land, W., R. Rudolph und W. Brendel
In vitro-Wirkung eines heterologen Antiserums auf Lymphozyten der Ratte: Eine elektronenmikroskopische Studie.
Blut 18, 1-12 (1968)
- 98) Land, W., R. Sebald, G. Grabs and W. Brendel
Prolongation of rabbit xenograft survival with antimacrophage serum in rats.
Eur. Surg. Res. 3, 28-39 (1971)
- 99) Land, W., J. Seifert, A. Fateh-Moghadam, U. Hopf und W. Brendel
Induktion einer Immuntoleranz gegen Pferdeserum-IgG beim erwachsenen Hund.
Z. ges. exp. Med. 151, 117-137 (1969)
- 100) Leder, L.-D.
The origin of blood monocytes and macrophages.
Blut 16, 86-98 (1967)

- 101) Loewi, G., A. Temple, A.P.P. Nind and M. Axelrad
A study of the effects of anti-macrophage sera.
Immunology 16, 99-106 (1969)
- 102) Lohmann-Matthes, M.L. and H. Fischer
T-cell cytotoxicity and amplification of the cytotoxic
reaction by macrophages.
Transplant. Rev. 17, 150-171 (1973)
- 103) Lubaroff, D.M. and B.H. Waksman
Delayed hypersensitivity: Bone marrow as the source of cells
in delayed skin reactions.
Science 157, 322-323 (1967)
- 104) Lubaroff, D.M. and B.H. Waksman
Bone marrow as source of cells in reactions of cellular
hypersensitivity. I. Passive transfer of tuberculin sensi-
tivity in syngeneic systems.
J. exp. Med. 128, 1425-1434 (1968)
- 105) Marsman, A.W.J., M. van der Hart and J.J. van Loghem
Antigenic differences between macrophages and lymphocytes.
Clin. exp. Immunol. 6, 899-903 (1970)
- 106) Martin, W.T. and J.F.A.P. Miller
Cell to cell interaction in the immune response. IV. Site
of action of antilymphocyte globulin.
J. exp. Med. 128, 855-874 (1968)
- 107) McFarland, W. and D.H. Heilman
Lymphocyte foot appendage: Its role in lymphocyte function
and in immunological reactions.
Nature 205, 887-888 (1965)
- 108) McFarland, W., D.H. Heilman and J.F. Moorhead
Functional anatomy of the lymphocyte in immunological
reactions in vitro.
J. exp. Med. 124, 851-857 (1966)
- 109) McKenna, J.M. and K.M. Stevens
Studies on antibody formation by peritoneal exudate cells
in vitro.
J. exp. Med. 111, 573-600 (1960)
- 110) Metchnikoff, E.,
Études sur la Résorption des Cellules.
Ann. Inst. Pasteur 13, 737-769 (1899)
- 111) Miller, J.F.A.P. and G.F. Mitchell
Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-
forming cells in neonatally thymectomized mice reconsti-
tuted with thymus or thoracic duct lymphocytes.
J. exp. Med. 128, 801-820 (1968)

- 112) Miller, R.G. and R.A. Phillips
Sedimentation analysis of the cells in mice required to initiate an in vivo immune response to shepp-erythrocytes.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 135, 62-67 (1970)
- 113) Mitchell, G.F. and J.F.A.P. Miller
Immunological activity of thymus and thoracic-duct lymphocytes.
Proc. nat. Acad. Sci. 59, 296-303 (1968)
- 114) Mitchell, G.F. and J.F.A.P. Miller
Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes.
J. exp. Med. 128, 821-837 (1968)
- 115) Mitchison, N.A.
Induction of immunological paralysis in two zones of dosage.
Proc. Roy. Soc. B 161, 275-292 (1964)
- 116) Mitchison, N.A.
Antigen recognition responsible for the induction in vitro of the secondary response.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32, 431-439 (1967)
- 117) Mitchison, N.A.
Immunological tolerance.
J. clin. Path. 20, 451-455 (1967)
- 118) Mitchison, N.A.
The immunogenic capacity of antigen taken up by peritoneal exudate cells.
Immunology 16, 1-14 (1969)
- 119) Möller, G. and H. Wigzell
Antibody synthesis at the cellular level. Antibody-induced suppression of 19 S and 7 S antibody response.
J. exp. Med. 121, 969-989 (1965)
- 120) Morgan, J.F., H.J. Morton and R.C. Parker
Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73, 1-8 (1950)
- 121) Mosier, D.E.
A requirement for two cell types for antibody formation in vitro.
Science 158, 1573-1575 (1967)
- 122) Müller-Hermelink, H.K. and W. Müller-Ruchholtz
Electron microscopic observations in rat lymph nodes following injection of AMS and ATS.
Third Internat. Conf. on Lymphatic Tissue and Germinal Centers in Immune Reactions, Upsala (1970)

- 123) Neiders, M.E., D.A. Rowley and F.W. Fitch
The sustained suppression of hemolysin response in
passively immunized rats.
J. Immunol. 88, 718-724 (1962)
- 124) Noack, W.
Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Entstehung
von Phagozyten und Fibroblasten auf peritonealen Implan-
ta-ten.
Blut 21, 35-47 (1970)
- 125) Noltenius, H. und M. Chahin
Antikörperbildung und Phagozytose: Funktion einer Zelle.
Z. Immunitätsf. Allerg. klin. Immunol. 139, 312-322 (1970)
- 126) Nossal, G.J.V.
Die Regulation der Immunantwort.
Klin. Wschr. 47, 568-573 (1969)
- 127) Nossal, G.J.V. and G.L. Ada
Recognition of foreignness in immune and tolerant animals.
Nature 201, 580-582 (1964)
- 128) Nossal, G.J.V., G.L. Ada and C. M. Austin
Antigens in immunity. IX. The antigen content of single
antibody-forming cells.
J. exp. Med. 121, 945-954 (1965)
- 129) Nossal, G.J.V. and C.M. Austin
Mechanism of induction of immunological tolerance.
II. Simultaneous development of priming and tolerance.
Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 44, 327-340 (1966)
- 130) Nossal, G.J.V., A. Cunningham, G.F. Mitchell and J.F.A.P.
Miller. Cell to cell interaction in the immune response.
III. Chromosomal marker analysis of single antibody-
forming cells in reconstituted, irradiated, or thymecto-
mized mice.
J. exp. Med. 128, 839-850 (1968)
- 131) Ouchterlony, O.E.
Diffusion in gel methods for immunological analysis II.
Progr. Allergy 6, 30 (1962)
- 132) Panijel, J. and P. Cayeux
Immunosuppressive effects of macrophage antiserum.
Immunology 14, 769-780 (1968)
- 133) Parkhouse, M.E. and R.W. Dutton
Inhibition of spleen cell DNA synthesis by autologous
macrophages.
J. Immunol. 97, 663-669 (1966)

- 134) Pearsall, N.N. and R.S. Weiser
The macrophage in allograft immunity. I. Effects of
Silica as a specific macrophage toxin.
J. Reticuloendothel. Soc. 5, 107-120 (1968)
- 135) Pearsall, N.N. and R.S. Weiser
The macrophage in allograft immunity. II. Passive transfer
with immune macrophages.
J. Reticuloendothel. Soc. 5, 121-133 (1968)
- 136) Perkins, E.H. and T. Makinodan
The suppressive role of mouse peritoneal phagocytes in
agglutinin response.
J. Immunol. 94, 765-777 (1965)
- 137) Pierce, C.W.
Immune responses in vitro. I. Cellular requirements for the
immune response by nonprimed and primed spleen cells in
vitro.
J. exp. Med. 130, 345-364 (1969)
- 138) Pinchuck, P., M. Fishman, F.L. Adler and P.H. Maurer
Antibody formation: Initiation in "nonresponder" mice
by macrophage synthetic polypeptide RNA.
Science 160, 194-195 (1968)
- 139) Pincus, W.B. and J.A. Flick
Inhibition of the primary vaccinal lesion and of delayed
hypersensitivity by an antimononuclear cell serum.
J. Infect. Dis. 113, 15-21 (1963)
- 140) Pribnow, J.F. and M.S. Silverman
Studies on the radiosensitive phase of the primary antibody
response in rabbits. I. The role of the macrophage.
J. Immunol. 98, 225-229 (1967)
- 141) Rabinowitz, Y.
Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leukocytes
and monocytes on glass columns, including tissue culture
observations.
Blood 23, 811-827 (1964)
- 142) Rhodes, J.M. and I. Lind
Antigen uptake in vivo by peritoneal macrophages from normal
mice, and those undergoing primary or secondary responses.
Immunology 14, 511-525 (1968)
- 143) Roberts, A.N.
Cellular localization and quantitation of tritiated antigen
in mouse lymph nodes during early primary immune response.
Am.J. Path. 49, 889-909 (1966).

- 144) Roscher, R.
Die Beeinflussung der experimentellen allergischen Encephalo-
myelitis mit heterologem Antilymphozytenserum bei der Ratte.
Inaugural - Dissertation, München 1969)
- 145) Roser, B.
The distribution of intravenously injected peritoneal
macrophages in the mouse.
Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 43, 553-562 (1965)
- 146) Roser, B.
The origins, kinetics and fate of macrophage populations.
J. Reticuloendothel. Soc. 8, 139-161 (1970)
- 147) Rowley, D.A. and F.W. Fitch
Clonal selection and inhibition of the primary antibody
response by antibody.
In: Regulation of the antibody response. pp. 127-140
Ed. by B. Cinader, Springfield, Ill./USA, Ch.C.Thomas
(1968)
- 148) Schoenberg, M.D., V.R. Mumaw, R.D. Moore and A.S. Weisberger
Cytoplasmic interaction between macrophages and lymphocytic
cell in antibody synthesis.
Science 143, 964 - 965 (1964)
- 149) Seeger, R.C. and J.J. Oppenheim
Synergistic interaction of macrophages and lymphocytes in
antigen-induced transformation of lymphocytes.
J. exp. Med. 132, 44-65 (1970)
- 150) Sharp, J.A. and R.G. Burwell
Interaction ('peripolesis') of macrophages and lymphocytes
after skin homografting or challenge with soluble antigens.
Nature 188, 474-475 (1960)
- 151) Sheagren, J.N., R.F. Barth, J. B. Edelin and R.A. Malmgren
Mechanism of reticuloendothelial system blockade produced
by antilymphocyte serum.
J. Immunol. 105, 634-641 (1970)
- 152) Shortman, K. and J. Palmer
The requirement for macrophages in the in vitro immune
response.
Cellular immunology 2, 399-410 (1971)
- 153) Simar, L.J. and E.H. Betz
Ultrastructural investigations on the inflammatory response
in skin allografts.
Path. Europ. 5, 131-144 (1970)

- 154) Sonntag, H.-G. und W. Müller-Ruchholtz
Über den Einfluß heterologer Antimakrophagenseren auf die
Überlebensdauer allogeneischer Rattenhaut-Transplantate.
Autoref., Mainz, (1968)
Zbl. Bakt. I. Ref. 215, 515 (1969)
- 155) Spector, W.G., M.N.-I. Walters and D.A. Willoughby
The origin of the mononuclear cells in inflammatory exudates
induced by fibrinogen.
J. Path. and Bact. 90, 181-192 (1965)
- 156) Thiede, A., H.-G. Sonntag und W. Müller-Ruchholtz
Unterschiedliche morphologische Veränderungen an Lymph-
knoten nach lokaler Applikation heterologer Antithymocyten-
und Antimakrophagen-Seren.
Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 3, 302-306 (1969)
- 157) Thorbecke, G.J. and B. Benacerraf
The reticulo-endothelial system and immunological phenomena.
Progr. Allergy 6, 559 - 598 (1962)
- 158) Turk, J.L. and L. Polak
Studies on the origin and reactive ability in vivo of
peritoneal exudate cells in delayed hypersensitivity.
Int. Arch. Allergy 31, 403-416 (1967)
- 159) Uhr, J.W.
Inhibition of antibody formation by serum antibody.
In: Regulation of the antibody response. pp. 114-126
Ed. by B. Cinader, Springfield, Ill./USA, Ch.C. Thomas
(1968).
- 160) Uhr, J.W. and J.B. Baumann
Antibody formation. I. The suppression of antibody formation
by passively administered antibody.
J. exp. Med. 113, 935-957 (1961)
- 161) Uhr, J.W. and G. Weissmann
Intracellular distribution and degradation of bacteriophage
in mammalian tissues.
J. Immunol. 94, 544-550 (1965)
- 162) Unanue, E.R.
Properties and some uses of anti-macrophage antibodies.
Nature 218, 36-38 (1968)
- 163) Unanue, E.R.
The immune response of mice to keyhole limpet hemocyanin
bound to macrophages.
J. Immunol. 102, 893-898 (1969)
- 164) Unanue, E.R. and B.A. Askonas
Two functions of macrophages and their role in the immune
response.
J. Reticuloendothel. Soc. 4, 440-441 (1967)

- 165) Unanue, E.R. and B.A. Askonas
The immune response of mice to antigen in macrophages.
Immunology 15, 287-296 (1968)
- 166) Unanue, E.R. and B.A. Askonas
Persistence of immunogenicity of antigen after uptake
by macrophages.
J. exp. Med. 127, 915-926 (1968)
- 167) Unanue, E.R. and J.-C. Cerottini
Persistence of antigen on the surface of macrophages.
Nature 222, 1193-1195 (1969)
- 168) Unanue, E.R. and J.-C. Cerottini
The immunogenicity of antigen bound to the plasma membrane
of macrophages.
J. exp. Med. 131, 711-725 (1970)
- 169) Volkman, A.
The origin and turnover of mononuclear cells in peritoneal
exudates in rats.
J. Exp. Med. 124, 241-253 (1966)
- 170) Volkman, A. and J.L. Gowans.
The production of macrophages in the rat.
Brit. J. exp. Path. 46, 50-61 (1965)
- 171) Volkman, A. and J.L. Gowans
The origin of macrophages from bone marrow in the rat.
Brit. J. exp. Path. 46, 62-70 (1965)
- 172) Wagner, H., M. Röllinghoff and G.J.V. Nossal
T-Cell-mediated immune responses induced in vitro:
A probe for allograft and tumor immunity.
Transplant. Rev. 17, 3-36 (1973)
- 173) Walford, R.L., R. Gallagher and G.M. Troup
Human lymphocyte typing with isologous antisera; technical
considerations and a preliminary study of the cytotoxic
reaction system.
Transplantation 3, 387-401 (1965)
- 174) Whitelaw, D.M.
The intravascular lifespan of monocytes.
Blood 28, 455-464 (1966)
- 175) Wigzell, H.
Antibody synthesis at the cellular level. Antibody-induced
suppression of 7 S antibody synthesis.
J. exp. Med. 124, 953-969 (1966)

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. W. Brendel für die Überlassung des Arbeitsplatzes am Institut für Experimentelle Chirurgie und für die ständige Unterstützung durch Anregungen und Hinweise im Verlauf der Arbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. W. Land danke ich für die Einführung in das experimentelle Arbeiten, für Rat und Hilfe im Verlauf der Experimente.

Für technische Unterstützung danke ich den med.-techn. Assistentinnen des Institutes.

LEBENS LAUF

- 15.5.1940 geboren in Waldenburg (Schlesien), als Sohn des Kaufmanns Alfred Grabs und dessen Ehefrau Ilse, geb. Weidemann.
- 1946-1951 Besuch der Grundschulen in Ostdorf und Hage (Kreis Norden, Ostfriesland)
- 1951-1961 Besuch des Ulrichsgymnasiums in Norden
Reifeprüfung am 15.2.1961
- 1961-1962 Ableistung des Grundwehrdienstes in Hamburg
- 1962-1964 Jurastudium an den Universitäten München und Erlangen
- 1964-1967 vorklinisches Studium an der Universität München
naturwissenschaftliche Vorprüfung im SS 1965
ärztliche Vorprüfung im WS 1966/67
- 1967-1970 klinisches Studium an der Universität München
- 1968-1970 Mitarbeit im Institut für Chirurgische Forschung
- 1970 ärztliche Prüfung am 23. Juni
- 1970-1971 Medizinalassistent im Institut für Chirurgische Forschung und der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Fürstenfeldbruck
- 1971 Approbation am 5. August
- 1971-1973 Assistenzarzt an den Chirurgischen Abteilungen der Kreiskrankenhäuser Fürstenfeldbruck und Memmingen und der Geburtshilflich-gynäkologischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Ochsenhausen
- 1973 Beginn der Facharztausbildung im Fachgebiet Anaesthesie und Wiederbelebung an der Neurochirurgischen Klinik der Universität München bei Prof. Dr. E. Enzenbach

